

SÉRIE A, N° 286

N° D'ORDRE

940

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Nicolas FLORESCO

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES MATIÈRES COLORANTES DU FOIE
ET DE LA BILE ET SUR LE FER HÉPATIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 27 janvier 1898, devant la Commission d'examen.

MM. BONNIER, *Président.*

DASTRE, }
VELAIN, } *Professeurs.*

PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

—
1898

SÉRIE A, N° 286

N° D'ORDRE

940

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Nicolas FLORESCO

1^{re} THÈSE. — RECHERCHES SUR LES MATIÈRES COLORANTES DU FOIE
ET DE LA BILE ET SUR LE FER HÉPATIQUE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 janvier 1898, devant la Commission d'examen.

MM. BONNIER, *Président.*

DASTRE, }
VELAIN, } *Professeurs.*



PARIS

G. STEINHEIL, ÉDITEUR

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1898

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen DARBOUX, *professeur*. Géométrie supérieure.

*Professeur hono-
raire*. HERMITE.

	DE LACAZE DUTHIERS	Zoologie, Anatomie, Physiol. comparée.
	TROOST	Chimie.
	FRIEDEL	Chimie organique.
	LIPPMANN	Physique.
	HAUTEFEUILLE. . . .	Minéralogie.
	BOUTY.	Physique.
	APPELL	Mécanique rationnelle.
	DUCLAUX	Chimie biologique.
	BOUSSINESQ	Physique mathématique et Calcul des probabilités.
	PICARD	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
<i>Professeurs</i>	POINCARÉ	Astronomie mathématique et Mécanique céleste.
	YVES DELAGE	Zoologie, Anatomie, Physiol. comparée.
	GASTON BONNIER . . .	Botanique.
	DASTRE	Physiologie.
	DITTE.	Chimie.
	MUNIER-CHALMAS . . .	Géologie.
	GIARD	Zoologie. Evolution des êtres organisés.
	WOLF	Astronomie physique.
	KÖNIGS	Mécanique physique et expérimentale.
	VÉLAIN	Géographie physique.
	GOURSAT.	Calcul différentiel et Calcul intégral.

<i>Professeurs ad- joint</i>	{	CHATIN	Zoologie, Anatomie, Physiol. comparée.
		PELIAT	Physique.
		PUISEUX.	Mécanique et Astronomie

Secrétaire FOUSSEREAU.

A MES CHERS MAITRES

M. ALBERT DASTRE

PROFESSEUR DE PHYSIOLOGIE A LA SORBONNE
MEMBRE DU CONSEIL CONSULTATIF DE L'ENSEIGNEMENT PUBLIC

M. ALEXANDRE N. VITZOU

PROFESSEUR A L'UNIVERSITÉ
DIRECTEUR A L'INSTITUT PHYSIOLOGIQUE DE BUCAREST

M. GR. STEFANESCOU

RECTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BUCAREST

INTRODUCTION

Ce mémoire résume le travail de trois années passées au laboratoire de physiologie de la Sorbonne.

La plupart des recherches qui y sont exposées, ont été exécutées sous la direction de mon maître M. le professeur Dastre à qui j'ai été heureux de servir de préparateur bénévole.

Je le remercie pour l'honneur qu'il m'a fait de m'associer à lui comme collaborateur et pour la part qu'il me cède de ces études communes. Je lui exprime ma reconnaissance pour ses savants conseils et pour la manière dont il m'a initié aux méthodes générales et aux procédés techniques de la science exacte.

Je me fais également un devoir de remercier et d'exprimer ma reconnaissance à mon premier maître, M. le professeur A.-N. Vitzou, dont j'ai eu l'honneur d'être pendant plusieurs années le préparateur et le chef des travaux physiologiques. Enfin je ne dois pas oublier l'*Alma mater*, l'Université de Bucarest, qui a mis libéralement à ma disposition une de ses bourses d'étude, non plus que le ministre de l'Instruction Publique M. le professeur Haret qui m'a honoré de sa bienveillance.

Ces études portent sur deux objets principaux qui formeront les deux divisions principales de notre mémoire :

1° Les pigments biliaires, c'est-à-dire les matières colorantes que l'on trouve dans la sécrétion du foie chez les vertébrés et chez un certain nombre d'invertébrés.

2° Les pigments hépatiques, c'est-à-dire les matières que l'on trouve dans le tissu lui-même du foie.

A ces deux questions principales sont venues se rattacher par un lien direct d'autres questions qui ne leur cèdent pas en importance, telles par exemple que la question du fer hépatique. La présence constante du fer dans le foie tant des vertébrés que des invertébrés a conduit à attribuer à cet organe un rôle particulier dans la fixation et l'évolution physiologique de cet élément essentiel à la vie ; c'est ce rôle que M. Dastre a caractérisé par le nom de *Fonction martiale du foie*.

PREMIÈRE PARTIE

PIGMENTS BILIAIRES EN GÉNÉRAL.

Matières colorantes de la bile en général. — La coloration de la bile est due à certaines substances, désignées sous le nom de pigments. La bile fraîche contient un seul pigment originel, dont tous les autres ne sont que des dérivés : c'est la bilirubine $C^{32}H^{36}Az^4O^6$ ou pigment jaune rouge.

Le dérivé, le plus important, le plus répandu, c'est la biliverdine $C^{32}H^{36}Az^4O^8$, qui s'obtient du précédent par simple oxydation. Tous les autres dérivés, qui se trouvent dans les calculs biliaires ou dans le tube digestif ou qui sont obtenus artificiellement, par la réaction de Gmelin, par l'iode alcoolique, par l'eau iodée, l'eau bromée et l'eau chlorée, proviennent de ces deux-là par oxydation, réduction ou hydratation.

D'après l'opinion générale, les deux pigments fondamentaux, bilirubine et biliverdine existeraient seuls dans la bile fraîche de la vésicule chez la plupart des vertébrés (abstraction faite de quelques pigments accessoires tels que la cholohématine du mouton, etc.) et le premier seul dans les canaux biliaires. Tous les autres pigments seraient des produits pathologiques.

Or, en cherchant dans quelles conditions la bile jaune se change en bile verte, nous verrons que le passage du jaune au vert ne se produit point seulement par la simple

oxydation de la bilirubine et le retour du vert au jaune par la simple réduction de la biliverdine. Cela démontre l'existence de pigments nouveaux différents des deux pigments précédents et intermédiaires entre eux.

On doit donc admettre que presque toutes les biles contiennent trois pigments : *le pigment originel*, un *pigment intermédiaire* et le *pigment définitif* ou *biliverdine*.

CHAPITRE PREMIER

Pigments biliaires isolés.

§ 1. — Pigment originel ou bilirubine.

a) État naturel. — La bilirubine existe-t-elle en dissolution dans les biles jaune ou rouge de l'homme et des animaux (porc, chien) ou en combinaison? Telle est la première question, qui nous a occupés. Nous avons constaté l'insolubilité de la bilirubine pure dans les constituants de la bile, pris isolément; dans les sels biliaires et dans le mélange nommé : bile décolorée, qui contient presque tous les éléments de la bile, sauf les substances colorantes.

Expérience 1. — On obtient la bile décolorée, en traitant la bile par la poudre de charbon animal, de la manière suivante (1) : 100 centimètres cubes de bile fraîche verte de veau, sont mélangés avec 40 grammes de noir animal bien lavé. Après quelques heures de repos, on évapore au bain-marie; la masse obtenue, refroidie, est traitée par l'eau distillée et ramenée au volume primitif. Le liquide est filtré, on obtient ainsi une liqueur claire, incolore.

Ceci posé, la bilirubine est mélangée à la bile décolorée dans les proportions de 1 centigramme pour 10 centimètres cubes. En agitant, le liquide se colore légèrement en jaune, mais la plus grande partie de la poudre se dépose sur le fond.

La teinte légère qu'on observe tient à la présence d'une petite

(1) Article Bile par le prof. A. DASTRE. *Dictionnaire de physiologie* de Ch. RICHET.

quantité de carbonates alcalins, qui possèdent la propriété de dissoudre la bilirubine, ou mieux de former une combinaison avec elle.

En effet, si l'on neutralise la liqueur exactement, par une solution diluée d'acide chlorhydrique à 1 pour 100, elle cesse de se colorer, la bilirubine n'y est pas du tout soluble.

En résumé, on doit admettre que dans la bile, la bilirubine ne se trouve pas à l'état de nature, mais à l'état de bilirubinate^s alcalins.

Il s'établit évidemment un partage des alcalis de la bile, entre les acides parmi lesquels, la bilirubine ; d'autre part, la quantité du pigment est très petite dans la bile, son pouvoir tinctorial étant considérable et les bilirubinate^s pourraient être considérés comme dissociés, à ce degré de dilution étendue. Ce n'est que dans ce sens, qu'il serait possible de dire qu'une petite partie de la bilirubine se trouve dans la bile, à l'état de nature (dissociation). En réalité la presque totalité est à l'état de combinaison alcaline.

Par rapport au pigment la bile peut donc être considérée, comme une solution de bilirubinate alcalin, dans le carbonate de soude.

b) Propriétés. -- La bilirubine a la fonction acide, c'est un acide monobasique, déplaçant l'acide carbonique des carbonates alcalins, en produisant des bilirubinate^s neutres. Quand on la fait agir sur les carbonates, elle se dissout d'abord, puis déplace une portion équivalente d'acide carbonique. La bilirubine est insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éther, l'alcool, la térébenthine, la glycérine à chaud ; plus soluble dans le sulfure de carbone, l'alcool amylique, la benzine et très soluble dans le chloroforme.

Ces solutions ont un pouvoir colorant très intense

une solution chloroformique à 1 pour 40000, colore encore en jaune les tissus ; par évaporation les solutions chloroformique, benzinique, laissent déposer la bilirubine à l'état cristallisé.

c) **Oxydation de la bilirubine.** — **Transformation du pigment.** — Nous étudierons, d'abord la bilirubine seule, en poudre, en solution chloroformique, en solution glycérique ; puis ses sels, les bilirubinales.

On sait que la bilirubine $C^{32}H^{36}Az^4O^6$, s'oxyde lentement à l'air et se change en biliverdine : $C^{32}H^{36}Az^4O^8$.

Cette transformation, se produit pour les bilirubinales [$C^{32}H^{35}NaAz^4O^6$] de couleur rouge-jaunâtre, qui se changent en biliverdinates [$C^{32}H^{34}NaAz^4O^8$].

Expérience 2. — La bilirubine en poudre laissée dans un tube à essai plusieurs mois, exposée à la lumière, en contact avec l'air, n'a subi aucun changement comme cela était évident a priori.

Chauffée à 100° pendant plusieurs heures, elle ne change pas davantage.

Expérience 3. — On prépare une solution de bilirubine dans le chloroforme :

Bilirubine, 0 gr. 01.

Chloroforme, 10 centimètres cubes.

On agite tous les jours, à la lumière. Après un mois, le chloroforme évaporé lentement, n'a laissé au fond du tube, qu'un amas d'une poudre de bilirubine et sur les parois un léger dépôt formé d'anneaux verts. Traitée par l'alcool, (la masse) prend une couleur verdâtre (biliverdine). L'oxydation de la bilirubine a été très faible ; elle a coïncidé d'ailleurs, avec l'altération lente du chloroforme.

La lumière détruit donc plus ou moins lentement les solutions de bilirubine dans le chloroforme.

Capranica (1) admet que la lumière peut amener l'oxy-

(1) CAPRANICA, *Archives de biologie italiennes*, 1882, p. 87.

dation de la solution chloroformique. Nous ne pouvons pas confirmer cette assertion.

Expérience 4. — Dissoute dans la *glycérine à chaud*, la bilirubine, après plusieurs jours, n'a pas changé ; de même avec les corps gras.

La bilirubine dissoute dans le chloroforme en quantité suffisante, est mélangée avec l'huile d'olive (neutre). Le mélange se fait très bien. En évaporant par la chaleur, le chloroforme, la bilirubine abandonne l'huile et se concentre au fond du tube dans la goutte de chloroforme non évaporé.

Ainsi dans tous les cas, grande résistance à l'oxydation directe, qui s'explique par la difficulté de contact avec l'oxygène.

En employant des agents oxydants : *l'eau oxygénée, la laccase*, le contact n'est pas moins difficile, il n'y a contact avec l'oxygène que pour les petites portions dissoutes dans l'eau chloroformée ; conséquemment oxydation à peu près nulle.

En résumé : la bilirubine elle-même est peu accessible à l'oxygène et difficilement transformable en biliverdine.

§ 2. — Les bilirubines.

On peut dissoudre la bilirubine (qui a une fonction acide) dans la soude ou les carbonates alcalins jusqu'à neutralité ; on a ainsi non pas une solution, mais un véritable sel.

A. — BILIRUBINATE DE SODIUM.

a) **Préparation.** — On prend 0 gr. 066 de bilirubine en poudre pour 100 centimètres cubes de la solution de carbonate de soude à 1 pour 1000. Le pigment se dissout rapidement, en prenant une couleur jaune rouge.

Le liquide contient du bilirubinate de soude et du carbonate de soude : c'est la solution alcaline. La solution neutre s'obtient en neutralisant exactement avec l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique ; c'est un liquide qui à côté du bilirubinate contient de l'acétate et du chlorure de sodium.

b) Propriétés. — Couleur. — Les bilirubinate alcalins sont solubles dans l'eau. Contrairement à l'opinion commune, ils y sont peu solubles (100 grammes d'eau dissolvent moins de 0 gr. 006 de bilirubinate de soude à la température ordinaire) ; ils sont solubles dans les alcalis et les carbonates alcalins.

La coloration d'une solution de bilirubine ou de bilirubinate varie graduellement du rouge grenat sombre au jaune paille, suivant la concentration.

Les couleurs extrêmes sont très différentes : rouge et jaune.

Prenons comme dissolvant le carbonate de soude à 1 pour 100 ; mettons-y un peu de bilirubine : si la quantité atteint 0 gr. 04 pour 100 du dissolvant, la couleur est rouge ; en ajoutant du dissolvant, la couleur devient jaune paille ; si l'on continue à étendre le carbonate de soude, la teinte sera seulement diluée.

On peut arriver au même résultat en employant des solutions de soude aux titres de 15 pour 100, 30 ou 60 pour 100 ; de même avec les acides.

La bilirubine acide et ses sels alcalins ont donc la même couleur.

Si nous traitons une solution de bilirubinate par un acide ou par un alcali, c'est-à-dire si nous passons de la bilirubine au bilirubinate ou inversement, nous n'observerons pas de changement de couleur ; il pourra se produire un précipité par l'acide, une redissolution par l'al-

cali, mais, dans aucun cas, nous n'aurons de changement de couleur.

D'après la couleur, on peut se faire une idée de la teneur en bilirubine d'une solution de bilirubinate et de sa réaction.

Les solutions de bilirubinate de soude dans l'eau, sont toujours jaune paille. Elles ne peuvent pas être rouges parce qu'elles ne contiennent pas pour cela assez de bilirubinate, qui est faiblement soluble dans l'eau ; aussi lorsqu'en prenant une solution de bilirubinate dans le carbonate à 1 pour 100, on neutralise par l'acide acétique ou l'acide chlorhydrique, une partie du bilirubinate est précipitée et la liqueur, tout à fait neutre, présente une couleur jaune paille claire, c'est là la teinte d'une solution neutre ; une couleur rouge indique au contraire un liquide riche en pigment et de réaction alcaline. Dans les liqueurs franchement acides le bilirubinate est simplement en suspension et se dépose à la longue.

c) **Action de divers agents. Transformation des bilirubines.**

LA LUMIÈRE ET L'AIR :

Expérience 5. — Préparons une solution de bilirubinate contenant : Bilirubine 0 gr. 01 ; Carbonate de soude 20 centimètres cubes de la solution 1 pour 100.

On remplit 2 tubes de contenance égale à 10 centimètres cubes, qu'on peut fermer à la partie supérieure grâce à un tube de caoutchouc, l'un est exposé à la lumière A ; l'autre est mis à l'obscurité B ; les tubes ne sont pas complètement pleins, il y a de l'air au-dessus du liquide ; après quelques heures, les 2 tubes agités nous montrent :

Tube B, une tendance au verdissement.

Tube A, verdissement.

La transformation (oxydation) à l'air et à la lumière est donc vraie pour les bilirubines, mais c'est une action encore lente.

RÉACTION. — A la lumière on peut ajouter l'influence de la réaction.

Expérience 6. — On part de la solution de bilirubinate : Bilirubine 0 gr. 01. Carbonate de soude 10 centimètres cubes de la solution 2 pour 100. Eau distillée 20 centimètres cubes.

On fait 7 échantillons contenant chacun 2 centimètres cubes de cette solution et amenée au même volume 5 centimètres cubes de la manière suivante :

1° Solution de bilirubinate neutralisée par acide acétique, étendue d'eau jusqu'à la dissolution parfaite du précipité.

2° Solution de bilirubinate étendue d'eau (faiblement alcaline).

3° Solution de bilirubinate étendue avec une solution de soude 15 0/0 (c'est-à-dire fortement alcaline).

4° Solution de bilirubinate étendue avec une solution de soude 30 0/0 (plus fortement alcaline).

5° Solution de bilirubinate étendue avec une solution de soude 60 0/0 (alcalinité très forte).

6° Solution de bilirubinate étendue d'une solution d'acide acétique 1 0/0 (faiblement acide).

7° Solution de bilirubinate étendue d'une solution d'acide acétique 10 0/0 (fortement acide).

Après 30 minutes d'exposition au soleil, nous observons :

N^{os} 1, 6, 7 sont devenus verts. Le n^o 2 est jaune rougeâtre, moins rouge qu'au commencement. C'est l'effet de la dilution, car, une portion de ce n^o 2 évaporée à 40° à moitié de son volume, de jaune devient rouge.

1 heure après, même état de choses ; 4 heures après : le n^o 2 est vert à la surface, le fond reste jaune ; le 3 a verdi légèrement, le 4 aussi, le 5 moins. Après 16 heures d'exposition au soleil : n^{os} 1, 6, 7 vert foncé ; n^{os} 2, 3 et 4, vert ; partout verdissement complet après 24 heures.

La réaction neutre ou l'addition d'acide accélère donc l'oxydation du bilirubinate.

ACTION DE LA CHALEUR. — La chaleur a une grande influence dans les transformations des bilirubines. L'action de la chaleur peut être de courte ou de longue durée.

Expérience 7. — *a) En présence de l'air.*

Chauffage à 100° et dans l'obscurité.

	après 1 heure	après 3 heures	après 14 heures
I. Bilirubinate neutre.	vert	vert pâle	brun jaune
Solution 1/100		dépôt brun	dépôt
II. Bilirubinate acide.	vert	vert	brun jaune
Solution 1/100		dépôt brun	dépôt
III. Bilirubinate alcalin.	jaune vert foncé	jaune vert	brun
Solution 1/100		moins foncé	précipité

Les expériences avec la solution à 1 pour 1000 donnent les mêmes résultats, c'est-à-dire : *verdissement et dépôt*.

Expérience 8. — *β) Dans le vide.*

	1 heure	3 heures	14 heures
IV. Bilirubinate neutre	vert faible	liquide	»
Solution 1/100	dépôt jaune au milieu	complètement décoloré	
		dépôt abondant	
V. Bilirubinate acide	vert faible	complètement	»
	dépôt abondant	décoloré	
Solution 1/100		dépôt abondant	
VI. Bilirubinate alcalin	jaune	jaune vert	jaune brun ; décoloré
			après 24 heures
Solution 1/100	petit dépôt	dépôt	dépôt

Mêmes résultats avec la solution à 1 pour 1000 ; c'est-à-dire : *verdissement partiel* du probablement à l'imperfection du vide, et *précipitation*.

En résumé, dans l'obscurité, les solutions de bilirubine dans le carbonate de soude (deux concentrations), les unes

à l'air, les autres dans le vide, ont donné les résultats suivants :

Les solutions neutre, acide et alcaline, chauffées à 75 et 100 degrés ont montré : 1° *Un verdissement* ; marqué chez celles qui étaient à l'air ; *léger* chez celles qui étaient dans le vide ; et 2° *Après 4 heures, une décoloration* chez les solutions neutres et acides ; la décoloration a lieu chez les solutions alcalines seulement beaucoup plus tard ; 3° *Il y a eu dépôt partout.*

Ainsi avec la bilirubine, dans le carbonate de soude ; la chaleur (75 et 100 degrés) produit trois phénomènes, suivant qu'elle est plus ou moins prolongée, à savoir :

D'abord le verdissement ; puis dépôt ; à la fin décoloration. Nous allons examiner successivement ces trois points.

d) **Verdissement. Dépôt.** — De quelle nature est le verdissement ? De quelle nature le dépôt ?

1° **VERDISSEMENT.** — L'addition d'alcali ramène la liqueur au jaune ; l'addition d'acide acétique glacial redonne le vert. Cette réaction est évidente au commencement du verdissement. Plus tard, lorsque la couleur a pris une teinte plus foncée (alors qu'il s'est formé un véritable biliverdinate), l'effet alternatif de l'alcali et de l'acide est nul.

Ce verdissement serait donc au début tout au moins différent de celui qui appartient à la véritable biliverdine ou aux biliverdinates, lesquels ne changent point par l'action des acides et des alcalis.

On observe un verdissement léger pour les tubes, qui sont dans le vide (vide incomplet) ; en tous cas, le verdissement est minimum. Le verdissement véritable et défi-

nitif a lieu pour les tubes, qui sont dans l'air. L'air est une condition de la transformation (oxygène).

Dans les tubes alcalins restés jaunes, il y a eu pourtant une modification du bilirubinate. On constate, en effet, que la chaleur et le contact prolongé de l'air ont transformé le bilirubinate de soude de telle sorte qu'il est devenu plus brun et 1° soluble dans l'eau ; 2° insoluble dans le chloroforme (celui-ci n'enlève donc pas le pigment à l'alcali qui s'y est combiné) ; 3° insoluble dans l'éther ; 4° soluble dans l'alcool.

Les deux premiers caractères appartiennent au bilirubinate. A cet égard, on ne distingue pas de changement ; mais voici le changement : Si l'on traite par quelques gouttes d'acide acétique glacial, il y a verdissement immédiat.

Cette substance verte est soluble dans l'acide acétique glacial ; elle est soluble dans le chloroforme, qui l'enlève à l'acide acétique ; elle est soluble dans l'éther ; elle est très soluble dans l'alcool.

De ces quatre caractères, les deux premiers appartiennent à la biliverdine ; les deux autres n'appartiennent pas à la biliverdine.

Le pigment jaune n'est donc pas le véritable bilirubinate et le pigment vert dans lequel il se transforme n'est pas le véritable biliverdinate ; ce sont des pigments particuliers nouveaux que nous avons appelés *pigments biliprasiniques*.

2° LE DÉPÔT. — Dans l'action prolongée de la chaleur, on observe qu'il se produit un dépôt qui varie de couleur : du jaune au jaune rougeâtre, puis au rouge brun.

Pour déterminer la nature du dépôt, on fait l'expérience suivante :

Expérience 9. — On prépare la solution de bilirubinate de soude contenant : Bilirubine, 0 gr. 08 ; Carbonate de soude 1 0/0, 50 cc.

Chauffée pendant 1 heure à 100 degrés, la liqueur devient verte et sur le fond, se dépose un précipité abondant.

On décante la partie qui surnage, en laissant sur le fond du tube le résidu avec une petite quantité de liquide.

Le résidu bien agité, est divisé en 3 parties : 1° Résidu agité et laissé en contact avec eau distillée. 1 heure après, le liquide filtré est jaune.

2° Résidu avec carbonate de soude 1 0/0 agité, 5 centimètres cubes ; le liquide filtré est plus jaune.

3° Résidu agité avec chloroforme 5 centimètres cubes, devient jaune.

Dans une autre variante, le dépôt a été traité de la manière suivante : le résidu jeté sur un filtre, est lavé avec le chloroforme jusqu'à épuisement. Celui-ci est coloré en jaune. Puis le résidu séché à l'étuve est traité de la même manière par le carbonate de soude ; après quelques heures, le liquide filtré est de couleur verte.

Il résulte de ces expériences que : le dépôt est formé, par un mélange de bilirubine non transformée, de bilirubinate soluble et insoluble et d'une petite quantité de biliverdinate. L'action prolongée de la chaleur décompose donc le bilirubinate ou l'altère.

e) **Décoloration.** — Dans le vide, il se produit une décoloration des solutions de bilirubinate longtemps chauffées, et un dépôt. Cette décoloration tient à la précipitation totale des pigments. En agitant, le liquide se recolore à cause du précipité très fin qui se remet en suspension.

Nous avons exécuté une expérience comparative synthétique portant sur douze échantillons et réunissant toutes les influences capables d'agir, à savoir : l'air et le

vide, la lumière et l'obscurité, la chaleur et la réaction. Cette expérience que nous ne rapportons pas ici met en lumière la part d'intervention des divers facteurs, dans la transformation des bilirubinales.

On constate : que *la lumière* exerce une action incontestable, s'il y a en même temps concours d'oxygène ; alors le verdissement est assez rapide, il se forme un dépôt ; que l'alcalinité de la liqueur constitue une condition défavorable à la transformation. Sous l'action du vide, il se forme un dépôt lent de bilirubinate devenu insoluble. Le dépôt peut être total et la liqueur complètement décolorée. Ce dépôt se redissout si l'on ajoute un alcali et la liqueur verdit si l'on ajoute un acide et que l'on opère à la lumière.

f) **Influence de la chaleur.** — L'influence de la chaleur est intéressante à suivre. Voici ce que l'on observe :

Expérience 10. — Nous avons chauffé à l'obscurité pendant une heure à 75° (thermostat) 4 tubes :

Deux d'entre eux contiennent du bilirubinate neutre (3) et (6), le tube (3) a été soumis au vide, le tube (6) contient de l'air.

Deux autres (III) et (VI) contiennent le bilirubinate alcalin, le tube III à vide, le tube VI à l'air.

Considérons d'abord la solution neutre, jaune paille. Le tube (3) dans lequel on a fait le vide (à la pompe à mercure, avec ajoutage spécial) est devenu légèrement vert clair, après 30 minutes ; après une heure, vert avec *précipité rougeâtre* ; après 24 heures, jaune avec précipité brunâtre.

Ainsi *il y a un verdissement léger* dans le vide et il faut signaler le caractère passager de cette couleur verte. D'ailleurs ce tube 3 devient jaune par l'alcali, vert par l'acide ;

c'est dire que la couleur verte n'est pas celle du pigment biliverdinique.

Si le chauffage se fait à l'air, avec la solution neutre (tube 6), on a un verdissement plus marqué, avec *précipité* jaune au bout d'une heure et demie. L'examen comparatif montre que l'action transformatrice est plus énergique que celle de la lumière. Avec la solution alcaline rouge, on observe la couleur jaune-brun ou jaune-clair *sans précipité*.

En résumé : *la chaleur même avec le vide (sans doute imparfait, malgré toutes les précautions) peut déterminer le verdissement ; c'est un agent énergique de verdissement. Son action se produit le mieux à l'air naturellement.*

g) **Influence de la réaction.** — Le verdissement est le plus facile dans les solutions les moins alcalines ; cela résulte des expériences précédentes. De plus, dans les solutions alcalines, il y a peu ou point de dépôt. *Le dépôt ne se produit pas en solution très alcaline.*

En résumé, dans la transformation du pigment jaune ou bilirubinate en pigment vert, interviennent 4 facteurs : 1° la présence de l'oxygène atmosphérique libre ou dissous ; 2° la chaleur ; 3° la lumière ; et 4° la réaction du liquide. La chaleur est un agent très efficace de cette transformation (1).

h) **Actions de diverses lumières. Spectre.** — Prenons une solution de bilirubinate préparée à la température ordinaire et à l'obscurité : deux conditions qui n'ont aucune influence altérante. On a vu plus haut l'influence transformatrice de la lumière.

(1) DASTRE et FLORESCO. Pigments biliaires. *Archives de physiologie*, 1897.

On peut se demander, si la lumière blanche ou les diverses lumières colorées, auront un effet particulier.

Nous avons projeté un spectre électrique, ayant une étendue de 35 centimètres au minimum de déviation et nous avons placé des tubes de bilirubinate dans diverses régions spectrales.

Tous se comportent à peu près de même : il semble qu'il y ait deux plages, où l'action de la lumière serait un peu plus accusée : l'une du côté du rouge et l'autre du côté du violet. Enfin il semble y avoir une autre bande dans le vert où l'action serait aussi un peu plus marquée.

Ceci est en accord avec l'apparence spectroscopique du bilirubinate, qui absorbe surtout les radiations aux deux extrémités du spectre avec une légère bande d'absorption dans le jaune vert entre D et E.

B. — BILIRUBINATE D'AMMONIUM.

Dans l'ammoniaque, la bilirubine se dissout parfaitement.

On prend la solution d'ammoniaque à 1/100 on obtient le bilirubinate ammoniacal en mélangeant : Bilirubine 0 gr. 01 ; Ammoniaque 10 centimètres cubes de la solution 1/100.

On peut faire avec cette solution les mêmes épreuves qu'avec le bilirubinate de sodium. On aura les mêmes résultats quant à l'action de l'air, de la lumière, de la chaleur.

Expérience 11.

		exposés 30 minutes au soleil	1 heure
<i>Tube (1).</i>			
Solution de bilirubinate . .	2 cc.	vert foncé	vert diminué
Neutralisé par acide acéti- que, donne précipité dis- sous par l'eau	3 »		

Tube (2).

Solution de bilirubinate	2 »	vert clair	vert foncé
Eau distillée	3 »		

Tube (3).

Solution de bilirubinate	2 »	vert clair	vert foncé
Solution d'ammoniaque			
1/100	3 »		

Tube (4).

Solution de bilirubinate	2 »	vert clair	vert foncé
Solution d'ammoniaque			
10/100	3 »		

La couleur tient à la quantité de bilirubine. La neutralisation favorise le mieux le verdissement. La liqueur commence à se décolorer, même après une heure. L'excès d'ammoniaque accélère la décoloration, qui est complète en 24 heures et sans dépôt. A l'obscurité aussi, se produit le verdissement. L'obscurité n'est pas une condition de *non-transformation* de la bilirubine ; plus la concentration ammoniacale est grande, plus le verdissement est accentué.

En faisant agir le vide, la lumière et la chaleur, le résultat est plus marqué.

La solution neutralisée, laissée dans le vide, à l'obscurité ou à la lumière, ne change pas ; au contraire avec la chaleur à 75° ou 100°, le pigment jaune se transforme en pigment vert. Les quatre agents d'ailleurs aboutissent à la décoloration et à la formation du dépôt ; en agitant les tubes le liquide se colore ; en laissant au repos le précipité se dépose.

La solution alcaline produit les mêmes phénomènes, mais plus lentement.

Action des acides. — Tous les acides favorisent la transformation du pigment jaune en pigment vert.

C'est d'abord l'acide formique le plus puissant, puis viennent par ordre décroissant les acides : acétique, chlorhydrique, butyrique et citrique.

C. — DÉTERMINATION DE LA QUANTITÉ DE BILIRUBINE
DANS LES BILIRUBINATES.

J'ai déterminé la quantité de la bilirubine dans la bile par le procédé de A. Jolles.

La solution alcoolique d'iode constitue un agent d'oxydation, gradué et faible, qui transforme complètement la bilirubine en biliverdine sans dépasser ce terme. La réaction a lieu d'après la formule $C^{32} H^{36} Az^4 O^6 + 4J + 2H_2O = C^{32} H^{36} Az^4 O^8 + 4HJ$, d'après laquelle 508 d'iode répondent à 572 de bilirubine, ou en d'autres termes 1 centimètre cube de la solution alcoolique d'iode centi-normale (1 gr. 27 pour 1000 d'alcool) correspond à 0 gr. 00144 de bilirubine.

La fin de la réaction est marquée par la coloration verte pure de liqueur ; par les caractères spectroscopiques de la biliverdine ; par l'invariabilité de la teneur en iode.

En titrant l'iode employé (différence entre la quantité ajoutée et celle qui reste en excès) on sait du même coup, combien il y a de bilirubine.

On emploie, pour l'opération, la bilirubine en solution chloroformique (1 centigramme pour 30 centigrammes de chloroforme) on ajoute la solution centi-normale d'iode par gouttes et on agite. La liqueur devient verte. On sait la quantité d'iode employé ; il faut savoir ce qu'il

en reste dans la liqueur. Pour cela, on emploie, comme dans le procédé d'iodométrie, la solution centi-normale d'hyposulfite de soude cristallisé (2 gr. 40 pour 1 litre d'eau), dont chaque centimètre correspond à 1 milligr. 27 d'iode.

Afin de faire agir cette solution aqueuse sur la solution chloroformo-alcoolique, il faut ajouter à celle-ci de l'iode de potassium (10 cc. de la solution à 1/10) et de l'eau (100 cc.). On ajoute à l'hyposulfite 3 à 4 centigrammes de liqueur d'amidon à 1/100 et l'on verse la liqueur alcoolique iodurée d'iode, dans une quantité donnée d'hyposulfite, jusqu'à coloration bleue de l'amidon iodé. La quantité d'hyposulfite employée fait connaître la quantité d'iode, qui existait dans la liqueur.

C'est là le procédé applicable pour la solution chloroformique de bilirubine. Mais quand on opère sur une liqueur complexe comme la bile, il faut prendre quelques précautions.

Dans ce cas, la solution d'iode agit rapidement sur la bilirubine, dans une première phase ; puis lentement sur les autres éléments de la bile ; les graisses, les acides gras et les acides libres. On prend 10 centimètres cubes de bile que l'on verse dans le vase d'Erlenmeyer de 150 centigrammes de capacité ; on y ajoute 5 centimètres cubes de chloroforme pur et on y fait couler goutte à goutte la solution alcoolique, jusqu'à transformation de couleur en vert. On procède ensuite à la détermination de l'iode en excès comme précédemment ; on connaît par différence l'iode employé à l'oxydation de la bilirubine et par suite la quantité de celle-ci.

A la fin de l'opération, on a deux couches : l'une de

chloroforme coloré en jaune et au-dessus la solution alcoolique verte.

En appliquant le procédé de Jolles aux biles, nous avons déterminé la quantité de bilirubine qui y est contenue (ou plus exactement, nous avons évalué en bilirubine les pigments biliaries).

§ 3. — Pigment définitif ou biliverdine.

La biliverdine, pigment définitif provient par oxydation de la bilirubine, dont elle diffère par deux atomes d'oxygène en plus $C^{32}H^3Az^4O = C^{32}H^{36}Az^4O^6 + O^2$.

Cette transformation se produit spontanément à l'air ; les solutions alcalines (bilirubinales) y verdissent lentement ; le verdissement est rapide en présence des agents oxydants et de la lumière.

a) **Solubilités.** — La biliverdine est insoluble dans l'eau et l'éther, comme la bilirubine. Mais à l'inverse de celle-ci elle est insoluble dans le chloroforme pur.

Elle est très soluble dans l'alcool (bleu verdâtre avec fluorescence rouge), et très soluble dans l'acide acétique glacial et dans la solution chloroformique d'acide acétique glacial : par quoi elle se distingue encore de la bilirubine. Ces remarques fournissent le moyen de séparer ces deux substances.

La biliverdine a la fonction acide ; elle forme des biliverdinates et elle décompose les carbonates alcalins.

Comme la bilirubine, la biliverdine (poudre) introduite dans une solution de carbonate de soude, s'y dissout d'abord, prend ensuite la place de l'acide carbonique et le biliverdinate se dissout lui-même dans la liqueur alcaline.

b) **Biliverdinates.** — Ils sont plus solubles dans l'eau

que les bilirubines. La biliverdine et les biliverdinates présentent la même couleur : du vert émeraude au vert foncé suivant la concentration. Par conséquent, si l'on traite une solution de biliverdinate alternativement par un acide ou un alcali, par l'acide acétique et la soude, il n'y aura pas de changement de couleur. Il n'y a pas de virage si l'on passe de la biliverdine au biliverdinate ou inversement.

Le courant d'acide carbonique ne change pas la couleur du biliverdinate.

Le vide aussi est sans influence sur les solutions de biliverdinates.

Les cinq caractères tirés : de la solubilité, de la stabilité et de la conservation de la couleur sous l'action de l'acide acétique, de la soude, de l'acide carbonique et du vide caractérisent le pigment vert, la biliverdine et les biliverdinates.

§ 4. -- Pigments intermédiaires ou biliprasiniques

La bilirubine se change en biliverdine, par simple absorption d'oxygène.

Mais, ce changement ne peut être obtenu que par des artifices chimiques. Hugounencq et Doyon l'ont réalisé avec le bioxyde de sodium, Jolles avec la solution alcoolique d'iode et nous-même par le bioxyde d'hydrogène, l'eau chlorée, bromée, iodée.

La transformation inverse de biliverdine en bilirubine peut être obtenue de même, par les moyens chimiques de réduction (amalgame de sodium) et nous-même l'avons produite, par le courant d'hydrogène sulfuré

Ces transformations ne se produisent pas spontanément

à l'air, pour la bilirubine vraie ; elle n'absorbe pas l'oxygène de l'air pour passer à l'état de biliverdine.

Ce sont les bilirubines qui deviennent biliverdines.

La transformation du bilirubinate (pigment jaune) en biliverdinate (pigment vert foncé) présente un stade intermédiaire : c'est la phase biliprasinique. Nous avons déjà prononcé ce nom. (Voir plus haut, p. 18).

Nous avons vu que l'action de la chaleur et de divers agents transformait le pigment bilirubinique en un pigment jaune, voisin de lui par sa couleur, seulement un peu plus brun que rouge ; de telle sorte que rien d'apparent ne signale ce changement. Mais on s'assure qu'il a eu lieu, et que le pigment jaune n'est plus le pigment bilirubinique. En effet, l'action de l'acide acétique le fait passer au vert ; de même le courant d'acide carbonique le fait passer au vert ; à l'abri de l'air (vide) sous l'influence de la lumière, il n'est pas stable ; tous caractères qui n'appartiennent pas au pigment bilirubinique.

Et, de même, nous avons vu qu'il existait un autre *pigment vert*. Celui-ci n'est pas le pigment biliverdinique, parce que l'action de l'alcali le change dans le pigment jaune précédent, parce que l'action du vide le change en un autre pigment jaune (bilirubinique) inattaquable par l'acide acétique ; tous caractères qui n'appartiennent pas à la biliverdine.

Ce sont ces deux pigments que nous avons appelés *pigments biliprasiniques*.

Ils sont définis par les caractères précédents dont le plus commode est l'emploi alternatif de l'acide et de l'alcali, c'est-à-dire ce que nous appelons la *réaction alcalino-acide* ou *acido-alcaline*. Cette réaction qui les fait virer du

vert au jaune ou du jaune au vert, ne produit rien avec les pigments bilirubinique et biliverdinique.

Cette même réaction nous montre la relation des deux pigments. Elle nous fait voir que l'un, le *pigment jaune*, est une combinaison alcaline de l'autre, le *pigment vert*. Le pigment vert est l'*acide biliprasinique*, ou *biliprasine* ; le pigment jaune est le *biliprasinate*.

Le *biliprasinate* est décomposé par l'acide carbonique, contrairement aux bilirubinales ; il n'est pas stable dans le vide à la lumière, contrairement à eux ; traité par l'acide acétique, il fournit un acide vert, contrairement à eux, encore.

L'*acide biliprasinique* ou biliprasine, ressemble à la biliverdine par sa solubilité dans l'acide acétique glacial et dans l'alcool. Il est soluble dans l'eau et la bile chargées d'acide carbonique en excès. Mais ce pigment diffère du pigment biliverdinique parce que : 1° il est ramené au jaune par les alcalis, 2° parce que sous l'action du vide il est dissocié et réduit à l'état de bilirubinate.

Tout ce qui va suivre va être le développement et la démonstration de ces caractères, de ces analogies et de ces différences. Nous insistons sur ce trait particulier, à savoir qu'il existe deux pigments biliprasiniques, tandis qu'il n'existe qu'un pigment bilirubinique et qu'un pigment biliverdinique. Cela tient à ce que la bilirubine acide et les bilirubinales alcalins ont la même couleur rouge jaune : la biliverdine acide et les biliverdinales alcalins, la même couleur verte ; tandis que, par exception à cette règle, le sel et l'acide biliprasiniques ont des couleurs différentes, jaune pour le sel, verte pour l'acide.

Nous voyons ainsi que par leur couleur les pigments biliprasiniques sont intermédiaires aux deux pigments fon-

damentaux ; ils participent de l'un et de l'autre. Ils leur sont encore intermédiaires, en ce qu'ils en viennent et y aboutissent.

Nous allons mettre en évidence, après leur existence, leurs relations avec les pigments fondamentaux.

Mais avant d'aborder ce programme, disons un mot de *leur nom*. Au lieu de forger un nom, nous avons donné à ces pigments *nouveaux* le nom de pigments *biliprasiniques*, c'est-à-dire un nom *ancien* que nous faisons revivre.

Le nom de biliprasine avait été introduit dans la science par Staedeler, puis il en avait été effacé, plus tard, lorsque, à la suite des travaux de R. Maly, on crut s'apercevoir que l'objet auquel il s'appliquait n'avait pas d'existence distincte. La biliprasine de Staedeler n'existerait pas. Ce qu'il a appelé ainsi serait, a-t-on dit, un simple mélange de biliverdine et de bilifuscine (1). C'est une erreur. Staedeler a pris pour biliprasine, un pigment pathologique (calculs) qui en réalité était un mélange de biliverdine et de notre véritable biliprasine. Le pigment bilifuscinique, dont nous n'avons pas à parler ici, n'a pas les caractères attribués par Staedeler à son pigment : il ne donne pas la réaction de Gmelin ; il ne vire pas par l'action alternative des acides et des alcalis. Dans la réalité, ce que Staedeler a eu entre les mains, c'est un mélange de biliverdine et de notre véritable biliprasine. Cette confusion suffit pour enlever de leur valeur à ses analyses et à la formule qu'il en avait déduite $C^{32}H^{44}Az^6O^{12}$; mais cela ne suffit pas à condamner le nom. Nous l'appliquons aujourd'hui à un produit très distinct de la biliverdine par les caractères indiqués plus haut, qui existe, ainsi que nous le verrons,

(1) A. GANGE, ASHER et BEYER, Die physiologische Chemie der Verdauung, p. 348. O. Hammarsten, Lehrbuch der phys. Chemie, 1891, p. 129.

dans les biles normales et qui constituait au moins une partie du produit de Staedeler.

Nous verrons tout à l'heure que les pigments biliprasiniques, correspondent à un stade intermédiaire entre la bilirubine et la biliverdine, *quand on passe de la première à la seconde au moyen des agents d'oxydation* en opérant en solutions étendues.

Cela semblerait établir que notre biliprasine n'est point identique au produit analysé par Staedeler. La *biliprasine* de Staedeler correspond, en effet, *au même degré d'oxydation que la biliverdine*. Elle ne diffère de celle-ci que par 4 molécules d'eau en plus.

Nous verrons que l'hydratation joue, en effet, un rôle dans sa formation. Elle exige pour se produire les solutions étendues c'est-à-dire un excès d'eau ; mais d'autre part, l'intervention des agents oxydants n'est pas contestable. Et l'expression réelle du phénomène est celle-ci : *Les pigments biliprasiniques prennent naissance quand on emploie, pour passer de la bilirubine à la biliverdine, les procédés d'oxydation en présence d'un excès d'eau.*

Cet énoncé, qui est l'expression fidèle des faits, n'exclut pas absolument la possibilité que la biliprasine soit un simple hydrate de la biliverdine. L'analyse chimique du pigment pur serait seule capable de donner une certitude à cet égard. Quoi qu'il en soit, et alors même qu'il ne serait qu'un hydrate particulier de la biliverdine, rien ne devrait être changé à ce que nous disons.

α) Réaction du milieu, chaleur, lumière, oxygène. — Voyons quelle est l'influence de ces quatre facteurs sur la formation et les transformations des pigments biliprasiniques.

RÉACTION DU MILIEU. — L'alcalinité nuit à la formation

du pigment biliprasinique. D'abord, elle est une condition défavorable à l'hydratation qui intervient avec l'oxydation dans cette formation. En second lieu, le pigment une fois formé, l'alcalinité s'oppose à la transformation du biliprasinate en biliprasine ; au contraire, la neutralisation favorise la formation et la transformation du pigment intermédiaire.

INFLUENCE DE LA LUMIÈRE. — Préparons une solution de bilirubinate (bilirubine dans le carbonate de soude).

Bilirubine 0 gr. 01.

Carbonate de soude 1 pour 100, 20 centimètres cubes, et préparons des tubes avec cette solution alcaline et d'autre part des tubes placés dans les mêmes conditions, mais avec la solution neutralisée.

Après quelque temps (de 2 à 24 heures), on constate que : dans les tubes à solution alcaline, il n'y a pas eu de virage, tant à la lumière qu'à l'obscurité ; les solutions neutralisées par l'acide acétique, ne changent pas de couleur, ne deviennent pas vertes. Elles ont néanmoins subi un changement qui se manifeste de la manière suivante : en ajoutant quelques gouttes d'acide acétique glacial la liqueur devient rapidement vert émeraude (biliprasine) ; avec l'alcali (soude 30 pour 100) elle retourne à sa couleur primitive rouge brun (biliprasinate). On peut répéter ces alternatives plusieurs fois, en employant avec précaution les doses d'acide et d'alcali.

La lumière a donc déterminé la transformation du bilirubinate en biliprasinate.

ACTION DE LA CHALEUR. — Si on soumet à la température de 50 degrés une solution de bilirubinate sodique neutralisée, on voit au bout de 30 minutes, que la couleur est devenue rouge brun ; on constate comme précédemment qu'il s'est formé un biliprasinate.

Une solution de bilirubinate faiblement alcaline, étant chauffée à 75° pendant 20 minutes, la couleur reste la même en se fonçant un peu : le stade biliprasinique per-

siste quelque temps. Ainsi, une réaction peu alcaline et la chaleur sont favorables pour le stade biliprasinique.

ACTION DE L'OXYGÈNE. — L'oxygène est nécessaire seulement dans la transformation du bilirubinate au biliprasinate et de celui-ci en biliverdinate. L'oxygène n'est pas nécessaire pour la transformation l'un dans l'autre des pigments biliprasiniques (biliprasinate en biliprasine ou inversement). Le bilirubinate peut devenir vert, sans oxydation nouvelle.

b) **Caractères différentiels des pigments biliprasiniques.** — Le pigment biliprasinique jaune (biliprasinate sodique) se distingue du pigment bilirubinique par les caractères suivants : 1^o le courant d'acide carbonique, le colore en vert (biliprasine) ; 2^o l'acide acétique cristallisable et en général tous les acides (surtout en présence de l'alcool) font de même ; 3^o il n'est pas stable, dans le vide ; il s'y décolore sous l'action de la lumière.

Le second pigment biliprasinique est vert (biliprasine). Il se distingue de la biliverdine par les caractères suivants : 1^o l'addition de quelques gouttes d'alcali le fait passer au jaune (biliprasinate) ; 2^o le vide le fait passer au jaune (bilirubine).

Le pigment jaune est la solution alcaline (sel alcalin) du pigment vert (acide).

L'acide biliprasinique est déplacé par CO_2 , tandis que pour la bilirubine et la biliverdine, c'est au contraire le pigment qui déplace l'acide carbonique des carbonates.

c) **Moyens de passer des pigments bilirubiniques aux biliprasiniques et inversement.** — En outre des 4 facteurs qui réalisent la formation du stade biliprasinique en partant du stade bilirubinique, on peut arriver au même résultat par les moyens chimiques suivants : l'iode alcoo-

lique, l'eau chlorée, l'eau bromée; en effet, en versant avec précaution de ces solutions sur le bilirubinate, le liquide prend une teinte vert clair (biliprasine). Cette biliprasine traitée par l'alcali, devient de couleur rouge brun (biliprasinate, sel alcalin); par l'acide acétique elle retourne au vert; 2° par le courant de CO^2 le bilirubinate neutre qui a subi l'influence modérée de la chaleur (50°) devient vert clair: c'est la bilipräsine; l'alcali la ramène au rouge brun (biliprasinate).

Arrivé au stade biliprasinique on peut retourner au stade bilirubinique par :

- 1° Le vide; la biliprasine devient jaune (bilirubine);
- 2° Le courant d'hydrogène sulfuré; la biliprasine est transformée en bilirubine;
- 3° Sulfure d'ammonium; même action.

d) **Action des agents oxydants. Moyens d'obtenir les pigments biliaires. Série ascendante.** — Par des artifices chimiques, on peut obtenir successivement les 3 stades des pigments biliaires; *pigment originel*, jaune, bilirubinique; *pigments intermédiaires*, jaune brun, biliprasinate, vert clair, biliprasine; et enfin *pigment définitif*, vert foncé, biliverdinique. Il suffit de faire agir, d'une manière ménagée, la laccase, l'eau oxygénée, l'iode alcoolique.

ACTION DE LA LACCASE. — Nous avons étudié l'action de l'oxydase la mieux connue sur la bilirubine. La laccase que nous avons employée a été préparée par G. Bertrand, qui a isolé ce ferment.

La solution employée a été la suivante :

Laccase, 0 gr. 02 ou 0 gr. 04, pour 10 centimètres cubes d'eau distillée.

Cette solution a été mélangée à parties égales avec une solution de bilirubinate sodique.

Expérience. — On prépare deux tubes, l'un absolument plein, sans atmosphère d'air, l'autre contenant de l'air.

Les deux tubes sont mis à la lumière diffuse, à la température ordinaire. Deux tubes témoins contiennent la même solution, mais la solution de laccase a été préalablement bouillie, avant d'être mélangée.

Après 6 heures et 24 heures, on observe les changements suivants : la solution de tubes témoins n'a pas encore verdi, elle reste jaune. Celui avec la laccase et sans atmosphère d'air a changé très peu.

Le tube qui contient de la laccase et de l'air présente une belle couleur vert clair (c'est de la biliprasine) donnant la réaction acide alcaline. Après 24 heures, la couleur est vert foncé : ne donne plus la réaction alcali acide.

Dans une autre expérience le tube où il y a de la laccase sans atmosphère libre, a subi un verdissement grâce à l'oxygène dissous.

En résumé la laccase favorise l'oxydation de la bilirubine et fait passer ce pigment par l'état de biliprasine et enfin de biliverdine. La laccase rend un peu plus facile la fixation de l'oxygène dissous (DASTRE et FLORESCO, *Archives de physiologie*, 1897).

ACTION DE L'EAU OXYGÉNÉE. — L'eau oxygénée que nous avons employée est à l'état neutre, mais elle ne contient que deux ou trois volumes d'oxygène.

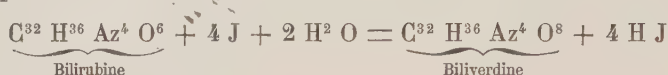
Avec la solution artificielle de bilirubinate, on observe un verdissement rapide suivi de décoloration ; ceci à l'abri de la lumière.

A la lumière, l'action est plus complète et plus rapide et de même en présence de l'air. Il y a en même temps dégagement d'oxygène. La décoloration est très rapide.

L'oxydation doit s'accompagner de quelque hydratation, de telle sorte que le stade biliverdinate est mal représenté dans la série de ces transformations. On n'aperçoit pas de verdissement. La décoloration sans ver-

dissement préalable est de règle avec les solutions plus concentrées d'eau oxygénée.

ACTION DE L'IODE ALCOOLIQUE. — La solution alcoolique d'iode, constitue un agent d'oxydation graduée, qui permet d'en suivre les phases. A. Jolles l'a employée pour transformer la bilirubine en biliverdine. La réaction a lieu d'après la formule suivante :



La liqueur jaune devient d'abord vert clair, puis vert foncé.

Expérience. — Dans un tube à essai, on met 10 cc. de la solution de bilirubinate et on verse goutte à goutte la solution alcoolique centi-normale d'iode (1 gr. 27 d'iode pour 1000 d'alcool). On emploie une petite pipette graduée en centièmes de centimètre.

Une division ou la moitié d'une division d'iode versée sur 10 centimètres cubes de bilirubinate, fait virer la couleur rouge en vert clair ; ce vert clair est la biliprasine ; car en ajoutant quelques gouttes de la solution de soude, la couleur devient jaune brun (biliprasinate) et par l'acide acétique retourne au vert (biliprasine). Le bilirubinate a été oxydé (et probablement hydraté en même temps) ; il a passé à l'état de biliprasinate et celui-ci, en présence de l'alcool acidifié par l'acide iodhydrique, a libéré la biliprasine.

En ajoutant encore de l'iode alcoolique, la solution de vert clair devient vert foncé : c'est de la biliverdine, car en ajoutant de la solution de soude à 30 pour 100, la liqueur verte reste verte ; la couleur verte est stable.

Les mêmes faits s'observent en traitant la solution de bilirubinate par l'eau iodée, l'eau bromée, et l'eau chlorée.

RÉACTION DE GMELIN. — Dans un verre à pied, qui contient de l'acide nitrique nitreux, on verse avec précaution la solution de bilirubinate. On voit apparaître la série

bien connue des couleurs caractérisant chacune un pigment distinct; si l'on fixe son attention sur la couleur verte, on voit que de vert clair au commencement, elle devient vert foncé, puis s'oxydant en plus se transforme en d'autres pigments.

e) **Retour inverse de la biliverdine aux pigments biliprasiniques et bilirubiniques. Série descendante.** — Si par l'oxydation, nous avons obtenu, en partant du stade bilirubinique, les stades : biliprasinique et biliverdinique (chaque stade étant déterminé par des caractères spéciaux), nous pouvons par des agents réducteurs obtenir l'inverse : en partant du pigment définitif ou biliverdine arriver au pigment originel ou bilirubine en passant par le pigment intermédiaire ou biliprasinique.

Ces agents sont les suivants : l'amalgame de sodium, l'acide chlorhydrique et le zinc, le courant d'hydrogène sulfuré, le courant électrique et le sulfure d'ammonium.

ACTION DE L'HYDROGÈNE SULFURÉ. — La biliverdine (réaction alcalino-acide négative) soumise à un courant d'hydrogène sulfuré naissant, passe rapidement de la couleur vert foncé au vert clair :

Ce liquide traité par un alcali (soude 30 0/0) devient rouge ; par l'acide acétique glacial devient vert, ce sont les caractères de la biliprasine et du biliprasinate.

En continuant l'action du courant d'hydrogène sulfuré, le liquide de vert qu'il était passe au rouge. La couleur est due à la bilirubine. En effet, la liqueur offre une réaction acide ; chauffée elle devient verte ; le vide prolongé ne change pas sa couleur ; la réaction de Gmelin est positive ; l'eau iodée, chlorée, bromée la verdissent.

Tous ces traits caractérisent le pigment bilirubinique.

CHAPITRE II

Pigments biliaires examinés dans les diverses biles naturelles.

Coloration de la bile en général. — L'étude détaillée, que nous avons faite des pigments isolés, peut être appliquée en tout aux diverses biles. Celles-ci subissent des transformations comparables à celles de la bilirubine et de ses sels.

La bile prise dans la vésicule peut être, suivant les animaux et les circonstances, rouge, jaune, brune, verte ou présenter un mélange de ces colorations.

Pour une grande partie ces colorations sont dues à la présence des deux pigments fondamentaux : la bilirubine qui donne la teinte jaune-rouge et la biliverdine qui fournit la couleur verte.

Mais indépendamment de ces pigments, il y a dans la bile normale des pigments biliprasiniques ; le pigment jaune-brun différent de la bilirubine (biliprasinate sodique) et le pigment vert (biliprasine) différent de la biliverdine.

Ils sont quelquefois tellement prédominants que ce sont leurs caractères, qui s'aperçoivent dans la bile. Les changements de couleur de la bile traduisent alors les changements de ces pigments et non point, comme on le croit, les mutations de la bilirubine et de la biliverdine.

Bile de veau.

A. — ÉTAT NATUREL.

La bile de veau (bile de la vésicule) est recueillie dans des vases (bien lavés à l'abri de la lumière), aussitôt que l'animal est sacrifié.

Propriétés. — *a) COULEUR.* — La bile de veau se présente sous l'une ou l'autre des deux couleurs : jaune, verte.

La couleur jaune est rare ; elle se rencontre 1 fois sur 20 à 50 fois ; le plus ordinairement la couleur est verte, Les deux couleurs ne dépendent ni de l'âge, ni du sexe de l'animal.

b) RÉACTION. — Cette bile est toujours plus ou moins alcaline.

L'alcalinité varie très peu : 3 centimètres cubes de bile sont neutralisés par 2 cc. 5 à 3 cc. 2 d'acide acétique à 1 pour 1000.

c) QUANTITÉ DES PIGMENTS. — En appliquant le procédé de Jolles à la bile de veau, nous avons déterminé la quantité de bilirubine qui y est contenue (ou plus exactement, nous avons évalué en bilirubine les pigments biliaires, 0.018 à 0.020 p. 100).

d) NATURE DES PIGMENTS. — Si on agite la bile avec du chloroforme, une petite partie passe dans le chloroforme et le colore en jaune : c'est de la bilirubine ; d'autre part la bile mélangée avec de l'alcool prend une couleur verdâtre ; c'est le pigment vert qui est mis en évidence (biliverdine, biliprasine) ; en même temps il se forme un dépôt, qui entraîne une petite quantité de pigments. On peut s'assurer de ce fait en décantant le liquide ; le dépôt traité par

le chloroforme et l'alcool fournit encore une petite quantité des pigments précédents. Outre ces pigments, il y a aussi, comme nous le verrons, une quantité considérable de pigments biliprasiniques.

B. — EXISTENCE DES PIGMENTS INTERMÉDIAIRES

BILIPRASINIQUES DANS LA BILE DE VEAU.

La bile de veau recueillie sur l'animal aussitôt après qu'il est sacrifié peut, avons-nous dit, se présenter avec la couleur jaune ou la couleur verte.

Ce dernier cas est de beaucoup le plus fréquent. Une fois de temps à autre, on trouve la bile jaune ; les autres fois, elle est verte.

I. — **Bile jaune de veau.** — En général, la couleur jaune de la bile de veau n'est pas la couleur jaune paille ; c'est un jaune mélangé de brun clair.

a) On a eu soin de la recueillir dans un flacon, qu'elle remplit entièrement et à l'abri de la lumière. On l'éprouve aussitôt que possible. Pour cela on l'emploie soit à l'état naturel, soit filtrée, soit mélangée de 4 volumes d'eau. On remplit une série de tubes à essai, de manière qu'il y en ait environ 5 centimètres cubes dans chaque. On ajoute alors 4 à 5 gouttes d'acide acétique glacial dans ces tubes. Ils passent immédiatement du jaune rougeâtre au vert émeraude. On traite le tube verdi par quelques gouttes de soude à 30 pour 100, de manière à neutraliser l'acide acétique, la liqueur repasse au jaune brun. On peut renouveler l'épreuve plusieurs fois, faire verdier le liquide par l'acide acétique, le ramener au jaune par la soude. La répétition se limite bientôt à cause de la trop grande dilution du liquide, qui ne permet plus d'observer avec netteté.

b) Si l'on a soin de chauffer cette bile jaune pendant 20 à 30 minutes à la température de 40° et à l'obscurité, la série des phénomènes est encore plus évidente.

c) Si, dans ces tubes contenant de la bile jaune, on dirige un courant d'acide carbonique, le liquide devient vert comme précédemment. L'alcali le ramène au jaune.

d) La couleur jaune de la bile naturelle ou de la bile alcalinisée après traitement par l'acide acétique n'est pas stable. Elle pâlit à la lumière, s'il n'y a pas d'air ; ou elle passe au vert (biliverdinate) s'il y a à la fois air et lumière.

Dans ce cas, le vert est différent du précédent, il n'est plus détruit par l'alcali et remplacé par le jaune. C'est le vert fixe de la biliverdine.

e) La liqueur verdie par l'acide acétique, si on la soumet au vide, se décolore en quelques heures. Elle redevient jaune. Ce n'est plus le jaune précédent ; l'acide ne le fait pas virer au vert. C'est le jaune de la bilirubine (bilirubinate).

II. — **Bile verte de veau.** — Nous avons dit que c'est le cas ordinaire ; le plus souvent la bile fraîche de veau est verte (4 fois sur 5 dans une série, 19 fois sur 20 dans une autre).

Soumettons-la à l'action alternative des alcalis et des acides et à l'influence du vide.

a) Dans un tube à essai on traite cette bile verte (soit diluée, soit à concentration naturelle), par quelques gouttes de soude à 30 pour 100 ; elle devient jaune, ce qui n'arriverait pas avec la biliverdine. On peut la faire reverdir avec l'acide acétique. Lorsque la bile est très concentrée, on peut répéter plusieurs fois cette transformation.

b) Au moyen de la pompe à mercure, nous faisons le vide (2 à 4 h.) dans un tube contenant quelques centimètres cubes de bile verte fraîche. On ferme le tube à la lampe. Après quelques heures, la couleur a passé au jaune, ce qui n'arrive pas avec la biliverdine (biliverdinate).

Cette épreuve mérite de nous arrêter quelques moments. Nous disons que le pigment vert soumis au vide se change lentement en pigment jaune et nous en faisons un caractère différentiel d'avec la biliverdine. Bien entendu, il faut exclure toute intervention microbienne, car les microorganismes changent à l'abri de l'air la biliverdine en un pigment jaune (urobilinoïde pour Hugou-necq et Doyon, bilirubinique pour d'autres). Mais ici l'action se produit assez rapidement ; elle aboutit à un pigment jaune qui a toutes les propriétés de la bilirubine, y compris la réaction de Gmelin. Néanmoins, pour écarter les objections, nous avons essayé d'éliminer toute action microbienne en chauffant le tube soumis au vide, à 75° à plusieurs reprises et même en le maintenant à 75°. Nous nous sommes assuré avec des tubes témoins, que ces traitements supprimaient en effet, les altérations microbiennes que nous voulions éviter. Le jaunissement avait encore lieu.

Expérience. — Bile verte de veau (donnant la réaction alcalino-acide) chauffée à 75° pendant 30 minutes, est divisée en 2 tubes :

1^{er} TUBE. — Le tube est fermé à cette température de 75° ; il n'y a pas de microbes.

2^e TUBE. — Bile verte chauffée à 75° soumise au vide prolongé pendant 14 heures. On observe : après 20 heures la bile est brune ; après 44 heures elle est rouge claire.

Après 72 heures changement de couleur et passage au brun marron. Pas de réaction alcalino-acide ; réaction de Gmelin.

Après 3 jours le 1^{er} tube resté vert est examiné. Il donne la réaction alcalino-acide. Il contient donc de la biliprasine. Le contenu est alors divisé en 2 parties :

a) Une partie chauffée à 75° pendant 30 minutes, et fermée à cette température, on constate qu'elle ne varie pas : elle est restée verte après 2 jours.

b) Une partie chauffée à 75° pendant 30 minutes, et soumise au vide pendant 14 heures :

Après 14 heures elle est brun foncé ; après 38 heures elle devient jaune rouge ; après 20 jours la bile reste encore jaune rouge clair.

Il n'y a pas de réaction alcalino-acide ; pas de réaction de Gmelin.

C'est dire que, par le vide, il y a eu dissociation du pigment vert, sans altération microbienné : il s'est formé du bilirubinate.

Nous concluons donc :

1° *Le pigment jaune de la bile normale de veau n'est pas la bilirubine (bilirubinate) ; l'action de l'acide acétique le fait passer au vert, l'acide carbonique le fait passer au vert ; il n'est pas stable à l'abri de l'air sous l'influence de la lumière, tous caractères, qui n'appartiennent pas à la bilirubine et qui démontrent l'existence du pigment rouge-brun ou biliprasinate.*

2° *Le pigment vert de la bile normale de veau n'est pas la biliverdine (biliverdinate), parce que l'action de l'alcali le change en pigment jaune, parce que l'action du vide le change en un autre pigment jaune (bilirubine) inattaquable par l'acide acétique, caractères qui n'appartiennent pas à la biliverdine ; c'est de la biliprasine ou pigment vert clair.*

III. — Formation du stade biliprasinique in vitro. —

Les pigments biliprasiniques de la bile dérivent du pigment originel fondamental (bilirubine) par oxydation. Le bilirubinate alcalin jaune-rouge se change en biliprasinate jaune-brun par fixation d'oxygène et d'eau. C'est là le point capital. Ce pigment une fois formé est mêlé dan

la bile aux bilirubines inaltérées. La bile est encore jaune. Elle devient verte dans un second stade, correspondant à la formation de la biliprasine, par suite de l'action sur le biliprasinate de l'acide carbonique. Celui-ci est très abondant dans la bile (au total, 561 de CO_2 pour 1000 de bile). Enfin, l'action de l'oxygène de l'air, aidée de la chaleur ou de la lumière, change le biliprasinate en biliverdinate (pigment vert définitif).

C. — ACTION DE DIVERS AGENTS. — TRANSFORMATIONS SUBIES
PAR LA BILE.

Expérience. — Prenons la bile jaune de veau.

a) **Air, lumière.** — On prépare 6 tubes, 2 tubes entièrement pleins; 2 pleins seulement à moitié, et 2 tubes dans lesquels le vide a été fait. Deux tubes (1 plein, l'autre à moitié) et les 2 tubes à vide sont mis à la lumière, les 2 autres à l'obscurité.

De temps en temps, on constate que le tube exposé à la lumière et plein à moitié (qui par conséquent contient seulement de l'air dissous dans la bile) verdit avant celui qui est plein. Les 2 tubes à l'obscurité restent inaltérés; ils conservent longtemps la même couleur. Enfin, celui des deux qui contient une atmosphère d'air commence à verdier à la surface; tandis que la bile dans les tubes à vide ne verdit pas.

On voit par là le rôle essentiel de l'air (ou mieux de l'oxygène); la lumière intervient comme l'acteur adjuvant; le pigment jaune est transformé en pigment vert.

b) **Influence de la réaction de la bile.** — En changeant la réaction de la bile, la transformation du pigment jaune en pigment vert est favorisée ou empêchée.

Expérience. — On laisse exposés à l'air, à la température ordinaire, les tubes suivants :

		après 15 heures	3 heures d'exposition au soleil.	6 heures
Bile jaune de veau 2 cc.		verte	commencement	décolora-
neutralisée. . . 3 »			de décoloration	tion com- plète
Bile normale . . . 2 »	jaune verdâtre		vert	décolora-
Eau distillée. . . 3 »				tion
Bile normale. . . 2 »	couleur verte		verte	liquide
				décoloré
Soude 15 0/0. . . 3 »				dépôt vert
Bile normale. . . 2 »	jaune		vert	commence-
				ment de dé-
Soude 30 0/0. . . 3 »	précipité jaune			coloration
Bile normale. . . 2 »	à la surface, li-		même	liquide
	quide incolore		chose	incolore
Soude 60 0/0. . . 3 »	au fond, pré-			précipité
	cipité jaune			jaune
Bile normale. . . 2 »	vert		vert foncé	vert foncé
Acide acétique 10/0 3 »	précipité en suspension		dépôt	dépôt

Il résulte de là que le verdissement a été le plus facile dans les tubes neutres ou acidifiés ; au contraire l'alcalinité a empêché cette transformation.

L'alcali à haute dose (à 60 pour 100) détermine une précipitation complète du pigment, et laisse le liquide incolore.

L'acide favorise la transformation du pigment jaune en pigment vert, d'abord vert clair, puis vert foncé c'est-à-dire en biliprasine (caractérisée par la réaction alcaline-acide), puis en biliverdine qui ne donne plus cette réaction.

c) **Action de la chaleur.** — La chaleur est après l'oxygène, le facteur le plus efficace de la transformation du pigment jaune en pigment vert.

Action prolongée de la chaleur.

Expériences.

α) *En présence de l'air :*

		Durée de chauffage	
		2 heures	5 heures 24 heures
I. Bile jaune neutre .	vert petit dépôt	jaune, rouge dépôt rouge	presque décoloré dépôt brun rouge
II. Bile jaune acide. .	vert laiteux	jaune rouge dépôt	presque décoloré dépôt brun rouge
III. Bile jaune alcaline.	jaune	rouge brun dépôt	presque décoloré dépôt brun rouge

β) *Dans le vide :*

IV. Bile jaune neutre .	vert pas précipité	jaune précipité rouge	décoloré dépôt brun rouge
V. Bile jaune alcaline.	jaune pas précipité	jaune dépôt rouge	décoloré dépôt brun
VI. Bile jaune acide. .	vert pas précipité	jaune dépôt rouge	décoloré dépôt brun rouge

Le chauffage des tubes se fait dans un thermostat à l'obscurité.

Le vide a été fait avec la pompe à mercure.

Dans ces expériences on observe 2 faits : 1° un changement de couleur qui aboutit finalement à la décoloration ; 2° la formation d'un dépôt, dont la couleur varie du jaune au brun rouge.

Comment expliquer ces faits ?

a) Prenons d'abord les solutions *en présence de l'air*.

TUBE I. — La solution neutre présente une couleur qui varie du jaune au vert, puis au jaune rouge ; enfin il y a décoloration et dépôt jaune, puis brun rouge.

En présence de l'air, de la chaleur et de la réaction neutre, trois facteurs qui favorisent l'oxydation, le bilirubinate et le biliprasinate passent à l'état de biliprasine (vert) : le premier, par l'action de l'air devient biliprasinate ; et le biliprasinate sous l'action de l'acide carbonique qui a été chassé des carbonates au moment de la neutralisation devient biliprasine.

Outre cet effet, la chaleur en a un autre. D'abord elle décompose à la longue la biliprasine par déshydratation et la réduit à l'état de bilirubinate. Cette transformation peut être expliquée par le vide qui se forme pendant le chauffage, et l'expulsion de l'air atmosphérique existant. Le passage d'un pigment à l'autre est accompagné de la formation d'un précipité. En prolongeant l'action de la chaleur qui altère les bilirubinate en les rendant insolubles, on amène leur dépôt et par suite la décoloration du liquide.

TUBE II. — L'insolubilisation amenée par la chaleur est encore bien plus facile dans les solutions acides qui déjà tendent à précipiter par elles-mêmes le pigment. Au commencement la couleur vert laiteux est due au mélange du vert avec le bilirubinate, qui reste en suspension.

TUBE III. — Dans les solutions alcalines il ne se forme pas de biliprasine ; la couleur varie du jaune au jaune rouge ; la chaleur amène la décoloration avec formation d'un dépôt.

L'alcalinité est donc un caractère de stabilité du bilirubinate. On conçoit qu'elle empêche le passage du biliprasinate à la biliprasine ; les carbonates ne sont pas

décomposés ; l'acide carbonique ne peut pas intervenir, sauf celui de l'air qui est en quantité insignifiante. Pour cette cause la couleur du liquide ne vire pas au vert, mais reste au rouge brun qui appartient au biliprasinate, lequel se développe par la chaleur. En continuant la chaleur, le bilirubinate non transformé et le biliprasinate sont altérés et précipités ; d'où décoloration du liquide et formation d'un dépôt.

b) Voyons maintenant ce que donnent les solutions *dans le vide*.

TUBES IV et VI. — Solutions neutre et acide.

Le liquide après 20' de chauffage présente une couleur verte; après 5 heures, jaune; puis il y a décoloration et précipité qui devient brun rouge.

Le biliprasinate (rouge brun) qui existe dans la bile, est mis dans des conditions favorables pour sa transformation en biliprasine (vert). La couleur verte est due à la transformation du biliprasinate en biliprasine, sous l'influence de la réaction favorable (acide). Tel est le premier stade. Dans le second, le vide décompose la biliprasine en bilirubinate, d'où couleur jaune du liquide; ce bilirubinate formé s'ajoute au bilirubinate existant non transformé et ces deux corps sous l'action prolongée de la chaleur sont altérés et précipités : d'où décoloration et dépôt.

TUBE V. — Dans la solution alcaline, le liquide reste avec une couleur jaune, c'est qu'il ne peut se former de biliprasine aux dépens du biliprasinate à cause de la réaction du liquide. La chaleur dépose le biliprasinate et le bilirubinate.

L'influence de la réaction est donc mise en évidence par ces expériences. La couleur des solutions dépend de

la formation de tel ou tel pigment, réglée elle-même par la réaction acide ou alcaline.

d) **Influence des diverses lumières, spectre.** — Comme nous l'avions fait pour le bilirubinate, nous avons soumis la bile de veau à l'action prolongée des diverses régions du spectre. On voit un verdissement léger dans le vert et dans les deux extrémités du spectre, du côté du rouge et du violet, ce qui correspond au spectre du bilirubinate.

D. — MOYENS D'OBTENIR LES PIGMENTS BILIAIRES EN SÉRIE ASCENDANTE. AGENTS HYDROLYSANTS ET OXYDANTS.

On a vu que les quatre pigments normaux dérivaien^t les uns des autres en série ascendante par des procédés d'hydratation et d'oxydation. On peut donc essayer de reproduire cette dérivation par l'emploi des agents hydrolysants et oxydants. De ce nombre sont : la papaïne (ferment soluble hydrolysant agissant en solution neutre) ; la laccase, ferment oxydant ; l'eau oxygénée, l'iode alcoolique, l'eau iodée, l'eau chlorée, l'eau bromée, le réactif de Gmelin.

Avec ces agents employés dans des conditions convenables, on obtient la succession des pigments : originel, intermédiaires et définitif.

On peut arrêter l'expérience à celui des pigments que l'on veut, en modérant suffisamment l'action. Le réactif de Gmelin est le seul, qui ne se prête pas à cette graduation de l'effet.

a) **Action des ferments solubles : laccase, papaïne.** — On mettra la bile en contact avec une solution renfermant le ferment soluble maintenue à 40°. Un second échantillon, destiné à servir de témoin, sera préparé avec

a même bile mélangée cette fois à la solution de ferment soluble bouillie, c'est-à-dire dans laquelle le ferment soluble aura été détruit.

Expérience.

		à l'obscurité à 37°.	
		après 20 minutes	1 heure
Bile jaune de veau.	5 cc.		
Solution de Laccase			
0 gr. 01/10 . . .	1 »	vert	vert foncé
Bile jaune de veau.	5 »	jaune	jaune
Solution de Laccase			
0 gr. 01/10 bouillie.	1 »		
Bile jaune de veau.	5 »		
Eau distillée. . . .	1 »	jaune	jaune

La bile en contact avec la laccase à 37° pendant 20 minutes, a pris la couleur vert clair : traitée par la soude, elle devient jaune, reprise par l'acide acétique, elle retourne au vert : c'est de la biliprasine. Après 1 heure de contact à 37° la bile devient vert foncé : la réaction alcalino-acide est négative : c'est de la biliverdine.

On obtient un résultat analogue, quoique moins marqué, en répétant l'expérience avec la papaïne. On part même de la bile verte fraîche de veau. Elle doit sa couleur à la biliprasine ; on s'en assure au moyen de la réaction alcalino-acide. Après l'action de la papaïne, la biliprasine a été transformée en biliverdine et biliverdinates, ne changeant plus lorsqu'on fait agir successivement l'alcali et l'acide acétique.

b) **Action de l'air, de la lumière, de la chaleur.** — La bile verte naturelle de veau (biliprasine) est étalée dans une soucoupe au soleil, en couche mince. Au bout d'un certain temps on constate que la couleur a foncé et que la biliprasine a fait place à la biliverdine (qui ne jaunit plus par les alcalis).

En chauffant cette même bile en présence de l'air, on

obtient également le passage à la biliverdine. Mais ces actions de l'air et de la lumière d'une part, de chaleur de l'autre sont lentes : elles exigent quelquefois des heures. Avec la papaine et la laccase, au contraire, elles sont rapides ; il ne faut plus que des minutes.

En résumé : les ferments solubles (laccase et papaine) transforment, même à l'obscurité, le pigment biliaire jaune en pigment vert clair, puis foncé, dans la bile normale, en fixant sur la bilirubine l'oxygène libre ou dissous dans l'eau.

c) **Action de l'eau oxygénée.** — L'eau oxygénée que nous employons est neutre ou très faiblement acide et contient seulement deux ou trois volumes d'oxygène.

Avec la bile il se produit un effet remarquable. La bile fraîche décompose instantanément l'eau oxygénée en dégageant l'oxygène. La bile fraîche jouit à cet égard d'une activité spécifique qui peut être comparée à celle de la fibrine. C'est là un premier fait curieux.

Mais ce qui est remarquable, c'est que la bile bouillie ne produit pas ce même effet.

Expérience. — On peut donner à l'expérience une forme saisissante, en employant les tubes à fermentation de Claude Bernard (tubes à essai à bouchon traversé par un tube à dégagement, dont une extrémité plonge au fond du tube à essai, tandis que l'autre est infléchie). Celui qui contient la bile fraîche se vide instantanément. L'autre reste plein. Une objection se présente aussitôt à l'esprit, en ce qui concerne cette différence d'action de la bile fraîche et de la bile cuite. Gernez a montré, en effet, que certaines poudres, qui décomposent habituellement l'eau oxygénée, cessent d'agir lorsqu'au préalable elles ont été fortement calcinées.

Il faut qu'il existe autour des grains une atmosphère (que la calcination fait disparaître) et qui est capable de fournir issue à l'oxygène dégagé du bioxyde d'hydrogène. D'après cela, on pourrait croire

qu'ici l'ébullition a fait disparaître de la bile tout le gaz dissous et que c'est pour cela que l'effet manifesté avec la bile fraîche, cesse de l'être avec la bile bouillie. Il n'en est rien. Si, après ébullition, on aère longtemps la bile par un courant d'air ou d'acide carbonique, le résultat est le même.

Il y a donc dans la bile fraîche une substance liquide qui jouit à un haut degré de la propriété de décomposer l'eau oxygénée et d'en dégager l'oxygène et que l'ébullition détruit. La bile fraîche constitue un réactif assez sensible de l'eau oxygénée.

On ne peut se défendre ici d'un rapprochement. La fibrine fraîche décompose de même l'eau oxygénée.

La fibrine cuite (longtemps) ne la décompose pour ainsi dire plus du tout. D'autre part, on sait que la fibrine crue contient divers ferments enlevés au sang et spécialement une oxydase.

On pourrait supposer que c'est cette oxydase que l'ébullition a détruite et qui décomposerait l'eau oxygénée. Peut-être serait-ce aussi une oxydase qui serait détruite dans la bile.

Quoi qu'il en soit, voici les faits : la bile fraîche, mise en présence d'eau oxygénée, produit un dégagement à peu près total et instantané de l'oxygène ; elle subit en même temps un verdissement fugace et bientôt après une décoloration.

Pour constater que le dégagement d'oxygène s'est fait du premier coup, d'une manière à peu près totale, on peut employer divers moyens ; l'un d'eux, emprunté à ces expériences mêmes, consistera à ajouter de nouveau un peu de bile fraîche ou de fibrine fraîche. On n'observera aucun dégagement.

La bile bouillie, au contraire, ne donne pas lieu à un

dégagement. Elle garde sa couleur de début, qui pâlit ensuite et disparaît à la longue après plusieurs jours. L'eau oxygénée n'a pas été détruite et deux mois après on peut encore s'assurer de son existence en ajoutant de la fibrine fraîche ou mieux encore de la bile fraîche, réactif le plus délicat de l'eau oxygénée.

On peut, en modérant l'action de l'eau oxygénée, obtenir les pigments biliaires en série ascendante. La bile fraîche jaune traitée par l'eau oxygénée devient vert clair (biliprasine donnant la réaction alcalino-acide), puis vert foncé ne donnant plus la réaction alcalino-acide, c'est la biliverdine : puis, avant la décoloration complète, apparaît une couleur rouge marron, correspondant à un stade encore inconnu de l'oxydation des pigments biliaires (chlolétéline ?). Ce pigment jaune rouge est caractérisé par un spectre particulier. Ce spectre ressemble à celui des vrais pigments biliaires, par l'absorption qui se fait aux deux extrémités, rouge et violette, mais il en diffère par l'adjonction de deux bandes, dans le rouge et le jaune.

Avec la bile bouillie on observe quelque chose d'analogue. Elle donne aussi, et d'une manière moins fugace, la succession des couleurs de la bile fraîche en présence de l'eau oxygénée, c'est-à-dire le vert clair, puis le vert foncé, puis le rouge, puis la décoloration. La coloration rouge du pigment qui se montre avant la décoloration diffère un peu de la précédente. Le spectre en est autre. Il offre, outre les deux plages du violet et du rouge, une seule bande intermédiaire, qui coïncide sensiblement avec celle qui était le plus près du rouge dans le spectre précédent.

En résumé, l'action de l'eau oxygénée nous a révélé une propriété remarquable, à savoir que la bile fraîche

est le réactif physiologique le plus délicat de cette eau oxygénée et en second lieu qu'il y a entre la bile fraîche et la bile qui a été soumise à l'action de la chaleur, des différences essentielles qui sont traduites dans le tableau suivant.

<i>Bile fraîche.</i>	<i>Bile cuite.</i>
avec l'eau oxygénée.	
1° Dégagement d'O.	1° Pas de dégagement apparent.
2° Coloration vert foncé persistant quelques heures.	2° <i>Idem</i> persistant plus longtemps.
3° Puis coloration rouge donnant un spectre à 2 bandes.	3° <i>Idem</i> (spectre à une seule bande).
4° Après 24 heures, commencement de décoloration.	4° La décoloration commence après un jour et se complète en 7-8 jours.
5° Décomposition à peu près totale de l'eau oxygénée.	5° Dans la bile bouillie, l'eau oxygénée se conserve longtemps, on peut la déceler après 2 mois dans le mélange décoloré (en ajoutant de la fibrine fraîche ou de la bile fraîche); il y a dégagement gazeux.

d) **Action de l'iode alcoolique.** — L'iode alcoolique (la même solution que nous avons employée pour l'étude du bilirubinate) est un agent d'oxydation graduée et faible, qui permet d'en suivre les phases.

Expérience. — L'iode alcoolique centi-normal est ajouté à la bile jaune fraîche de veau au moyen d'une pipette graduée en centièmes de centimètres cubes :

1° On ajoute 1 centième de centimètre cube de la solution centi-normale à 1 centimètre cube de bile jaune fraîche, celle-ci devient de couleur vert clair. Ce produit, c'est de la biliprasine (il rougit par l'alcali et redevient vert par l'acide acétique).

2° On ajoute à la même quantité de bile 2 divisions d'iode alcoolique, la couleur est vert foncé (persistant par l'alcali) ; c'est de la biliverdine, biliverdinates.

Si l'on continue à ajouter de l'iode alcoolique, la couleur subit de nouveaux changements, bleu, jaune, rouge puis la liqueur se décolore.

e) **Action de l'eau chlorée, eau bromée.** — Avec l'eau chlorée, l'eau iodée, l'eau bromée, nous avons les mêmes résultats. Nous signalerons des colorations bleuâtre, puis quelquefois bleu intense, plus ou moins fugaces ; plus tard se montre jaune.

f) **Réactif de Gmelin (Acide azotique nitreux).** — Les actions oxydantes précédentes, se prêtent à une gradation d'effet, qui nous permet d'obtenir chaque produit, caractérisé par une couleur différente. Avec l'acide nitrique nitreux (réactif de Gmelin), on obtient les mêmes produits, les mêmes couleurs ; mais l'action se précipite, les teintes se succèdent sans qu'on puisse les séparer.

La bile de bœuf donne mal la réaction de Gmelin (Sal-kowski). La bile humaine, la bile de chien et la bile de porc la donnent bien à la condition d'être diluées. Cette dilution empêche l'abondance du précipité de pseudomucine, qui dissimule ou empêche l'observation. Le type de la réaction de Gmelin est fourni par la bile de veau. Cette différence de la bile de veau (nourrie au lait) et de la bile de bœuf, est intéressante. C'est une différence de l'état jeune et de l'état adulte, qui traduit peut-être simplement la différence d'alimentation.

Que ce soit une différence d'alimentation, ou une différence d'âge, qui se manifeste ainsi, le fait n'en est pas moins digne de remarque.

On opère sur la bile de veau jaune ou verte. Voici brièvement la série des phénomènes ;

Manière d'opérer. — On verse dans le fond d'un petit verre à réaction une petite quantité d'acide azotique nitreux (acide nitrique traité par une goutte de mercure). Au-dessus, au moyen d'une pipette, on fait arriver la bile avec précaution, de manière à éviter l'agitation et le mélange des deux liqueurs. A la limite de séparation, l'acide azotique diffuse et réagit sur le liquide biliaire ; il se produit dans celui-ci une série de couches superposées, correspondant à des degrés divers d'oxydation, les plus oxydées en bas.

Les phénomènes se succèdent d'ailleurs aussi dans le temps. Ces couches paraissent d'abord se partager en deux groupes : le groupe inférieur *jaune rouge* ; le groupe supérieur : *violet bleu*.

Puis, chaque groupe se nuance ; au bas du groupe inférieur, le rose apparaît ; au haut, le vert clair, qui devient rapidement vert foncé et persiste quelque temps ; dans l'intervalle l'orangé et le rouge, qui disparaissent bientôt et toute la couche prend une teinte rosée de plus en plus pâle. En même temps un précipité blanchâtre servant de support aux couches colorées s'accroît. Pour le groupe supérieur d'abord le vert passe par place au bleu, puis toute la couche verte devient bleue, puis passe au violet ; et à la fin de l'opération, qui dure de 15 à 20 minutes, au rose pâle.

BILE DE BŒUF. — Avec la bile de bœuf, les phénomènes sont moins nets. Cette particularité tient à ce que le précipité blanchâtre envahit irrégulièrement l'épaisseur tout entière de la zone biliaire et empêche la superposition régulière des couches d'oxydation.

La seconde particularité c'est que la couche verte, qui dans le cas précédent était persistante et mieux marquée, ici est fugace. Toutes les couches sont mélangées à cause de l'apparition d'une bande (formée par le précipité) qui donne des ramifications en haut et en bas.

Chez le veau la couche superficielle tout à l'heure était formée, à la fin de l'expérience, par une série de zones concentriques variant du vert (au centre) au bleu et au violet en marchant vers les bords du verre. Avec la bile de bœuf, tout est mélangé.

En résumé, les phénomènes essentiels sont les mêmes avec la bile de bœuf qu'avec celle de veau, mais l'observation est rendue difficile par le précipité azotique et c'est

dans ce sens qu'il faut entendre l'assertion des auteurs que la « bile de bœuf donne mal la réaction de Gmelin ».

g) **Action de l'acide carbonique.** — L'acide carbonique permet de passer dans la série ascendante, d'un pigment intermédiaire au suivant. En faisant passer un courant de CO_2 dans la bile jaune de veau, on obtient une coloration vert clair, qui traduit la transformation du biliprasinate de sodium en *biliprasine* (réaction alcalino-acide). Plus tard, on arrive même au pigment biliverdinique ; alors, la réaction alcalino-acide est négative.

E. — PIGMENTS BILIAIRES EN SÉRIE DESCENDANTE. AGENTS RÉDUCTEURS. CAS DE L'HYDROGÈNE SULFURÉ.

Les artifices chimiques, consistant dans l'emploi des agents d'oxydation, nous ont permis d'obtenir en série ascendante les divers pigments biliaires. Inversement l'emploi des agents réducteurs va nous permettre d'obtenir les mêmes pigments en série descendante. Ces agents sont l'amalgame de sodium, le sulfhydrate d'ammoniaque, l'acide chlorhydrique et le zinc et le courant électrique.

Nous parlerons seulement du courant d'hydrogène sulfuré, qui est d'un usage commode.

On part d'une bile ne contenant que le pigment supérieur, biliverdinate et biliverdine.

On l'obtient au moyen de la manière suivante :

La bile verte fraîche de veau est chauffée pendant 20 minutes à 100° ; il se produit un précipité, qui est séparé par le filtre ; le filtrat est recueilli : il est vert foncé.

Ce pigment vert c'est de la biliverdine (la réaction alcalino-acide est négative).

Cette bile, soumise à un courant d'hydrogène sulfuré, change de couleur dès les premières bulles gazeuses. De

foncée elle devient vert clair ; et alors le liquide traité par la soude devient rouge, puis par l'acide redevient vert ; c'est la biliprasine.

En suivant l'action du courant, on voit la couleur passer au jaune rouge.

Qu'est-ce que ce pigment rouge ?

C'est de la bilirubine mélangée au biliprasinate du début comme le prouvent les caractères suivants :

1° La réaction de Gmelin est positive :

2° Traité par la chaleur, en présence de l'air, il verdit ;

3° L'eau iodée, l'eau bromée, l'eau chlorée le transforment en pigment vert ;

4° Le vide ne change pas sa couleur ; ce sont là quatre caractères de la bilirubine ;

5° L'acide acétique le colore en vert ;

6° Par le courant de CO_2 il devient vert clair (la réaction alcalino-acide est positive) c'est-à-dire biliprasine (ce sont là deux caractères du biliprasinate),

F. — FORMATION ET ÉVOLUTION DES PIGMENTS BILIAIRES NORMAUX AUX DÉPENS DU PIGMENT ORIGINEL.

Après avoir vu les transformations des pigments biliaires, *in vitro*, il faut se demander comment elles s'accomplissent *in vivo* ?

Et d'abord, on ne peut douter de l'existence de ces transformations. Il est infiniment vraisemblable que le pigment originel de la bile est la bilirubine (bilirubine, bilirubinate). La bile première est donc jaune. Ce n'est que postérieurement que se produisent les pigments biliprasiniques et biliverdiniques qui la colorent en brun ou en vert dans la vésicule biliaire. Où se produit cette transformation ?

C'est la première question à résoudre.

L'observation faite chez quelques animaux à bile vésiculaire verte, trouvée jaune dans les canaux hépatiques, semble indiquer que les changements ne se produisent qu'au delà de la cellule hépatique et même des canalicules hépatiques, dans les gros conduits biliaires et dans la vésicule. C'est l'opinion que nous adopterons.

Mais d'autre part il y a des arguments pour admettre le contraire. Ces arguments sont tirés de la difficulté qu'il y a à comprendre la production, dans les conduits biliaires, des phénomènes d'oxydation qui sont nécessaires au changement de la bilirubine.

La difficulté serait évidemment moindre au niveau de la cellule hépatique, qui est coutumière d'oxydations. Là, les conditions physiologiques d'oxydation qui président au fonctionnement hépatique ont encore toute leur activité.

Au delà, les conditions physiques agissent seules et celles-ci ne sont pas favorables à la transformation du pigment bilirubinique.

En effet, les solutions de bilirubinate, pigment jaune fondamental, se conservent longtemps telles quelles en milieu alcalin, à l'obscurité, à une température inférieure à 40° et cela en présence de l'air ; à plus forte raison à l'abri de l'air.

Dès lors, si l'on admet qu'au moment de la formation, la bile est *une solution de bilirubinate dans les carbonates alcalins* ; ou en d'autres termes que le pigment originel, le premier formé, source des autres, est la bilirubine, on doit se demander comment la bile des dernières voies et tout au moins celle de la vésicule peut contenir ces autres pigments, les pigments biliprasiniques et la biliverdine.

En effet, aucune des conditions d'oxydation et d'hydratation n'est réalisée ; il n'y a pas de contact avec l'oxygène atmosphérique ; l'oxygène dissous existe en très faible quantité (2 pour 1000), à la rigueur pourtant suffisante : mais la lumière n'a pas accès ; la température est inférieure à 40° ; enfin, l'eau de solution diminue dans la vésicule et la bile se concentre, circonstance défavorable à l'hydratation. Et cependant, l'observation apprend que ces transformations se sont produites puisque les pigments biliprasiniques et biliverdiniques existent dans la bile normale ; et, d'autre part, l'expérience faite avec la bile fraîche montre que les transformations qui restent à accomplir, sont plus faciles qu'avec les solutions artificielles de bilirubinales.

Si donc l'on rejette l'idée que les pigments biliprasiniques existent dès la cellule hépatique, on sera obligé d'admettre qu'il existe un agent particulier d'oxydation. Cet agent particulier subsistant dans la bile ne serait autre chose qu'un ferment hépatique de la nature des oxydases. Il y aurait une oxydase destinée à réaliser les combustions hépatiques. Telle est l'hypothèse, d'ailleurs assez vraisemblable. Le reste va de soi : une partie de cette oxydase pourrait être entraînée par la bile jusque dans la vésicule.

C'est elle qui faciliterait l'oxydation des pigments, oxydation que des conditions physiques ordinaires ne semblent pas permettre d'expliquer suffisamment.

Les arguments plus directs à l'appui de cette supposition sont les suivants : 1° le fait que la bile fraîche bleuit la teinture de gaïac, tandis que la bile bouillie (même après agitation à l'air pour dissolution d'oxygène) ne donne pas cette réaction ; 2° le fait que la bile fraîche dé-

compose immédiatement l'eau oxygénée et en dégage l'oxygène, tandis que la bile bouillie ne se comporte pas ainsi ; 3° le ferment oxydant typique (la laccase de G. Bertrand) favorise l'oxydation de la bilirubine dans les solutions artificielles, c'est-à-dire la formation des pigments biliprasiniques et des biliverdinates. La solution verdit à la température ordinaire, même à l'obscurité.

G. — TENTATIVES POUR MANIFESTER L'OXYDASE HÉPATIQUE.

Nous avons fait diverses tentatives pour manifester cette oxydase hypothétique soit dans la bile même, soit dans le tissu hépatique. En ce qui concerne la bile nous partions de cette idée que les biles jaunes riches en bilirubinales sont celles qui n'ont entraîné qu'une quantité insignifiante d'oxydase. Au contraire une bile verte dès les canaux hépatiques, aura entraîné de l'oxydase. S'il en est ainsi on devra, en mélangeant une petite quantité de bile verte naturelle (qui est supposée contenir l'oxydase) à une bile jaune (bilirubinique), qui ne la contient pas, amener une oxydation de cette dernière.

Quelques essais de ce genre ont semblé vérifier cette induction. Mais ils sont trop incomplets pour que nous les rapportions ici.

En second lieu, nous avons essayé de manifester l'oxydase dans le tissu du foie lavé. Ce tissu séché, mis à macérer avec le fluorure de sodium, nous a fourni un liquide que nous avons mélangé à la bile jaune. Nous n'avons pas obtenu de résultat. La tentative, cette fois, a été nettement infructueuse.

Cependant d'autres auteurs ont traité de l'oxydase du foie. Dans la liste des tissus étudiés par Salkowski, Jaquet,

Abelous et Biarnès, le foie est l'un des plus remarquables : au point de vue oxydant, il occupe le premier ou les premiers rangs.

Récemment M. Portier (*Les oxydases*, p. 83) acceptant l'existence de l'oxydase, comme cause de la transformation des pigments biliaires dans la vésicule, en a attribué l'origine, non aux cellules hépatiques, mais aux globules blancs. Il part de ce fait qu'il existe une diapédèse des leucocytes à travers les parois du tube digestif. Celle-ci serait très active au niveau de la vésicule biliaire. Les leucocytes traversant en grand nombre les parois de la vésicule s'y détruiraient et y mettraient en liberté leur oxydase. C'est cette oxydase qui transformerait la bilirubine en biliprasine, en biliverdine.

CHAPITRE III

Variétés des pigments biliaires.

Biles des divers animaux.

a) **Variété de bile jaune de veau.** — Il arrive que l'on trouve parmi les différents échantillons de bile jaune de veau (3 fois sur 100 environ) des biles de nature particulière. Lorsque, en effet, on traite cette bile par l'acide acétique, au lieu de devenir verte par transformation du biliprasinate en acide biliprasinique, elle devient rouge. De même en la traitant par la chaleur, par les agents oxydants : la laccase, l'eau oxygénée, l'iode alcoolique, l'eau iodée, etc., cette bile devient rouge foncé. Il y a donc, en outre du pigment jaune brun habituel passant au vert, un autre pigment de même couleur, pigment exceptionnel, qui, sous les mêmes influences des acides, ou des oxydants, passe au rouge. Cette couleur est assez vive pour masquer la teinte verte.

Nous avons examiné le spectre d'absorption de cette bile :

Ce spectre présente une absorption des régions rouge, violette et une bande large en D.

Mac Munn a observé aussi que les biles de veau et bœuf laissées à l'air prennent graduellement la teinte rouge d'un pigment nommé par lui cholohématine. Quant au pigment rouge résultant de l'action de la chaleur et des

divers agents oxydants, il se rapproche par sa couleur et son spectre de la cholohématine de Mac Munn.

b) Bile de porc. — On recueille la bile fraîche de la vésicule chez un porc, qu'on vient de sacrifier. Elle présente une couleur rouge. Elle est rendue trouble par un précipité pulvérulent qui se dépose difficilement. Sa réaction est toujours alcaline. En filtrant, on obtient un liquide rouge rubis clair ou sombre de couleur assez intense, constitué par le bilirubinate de soude. Sur le filtre, reste le dépôt jaune rouge granuleux de même nature.

QUANTITÉ DE LA BILIRUBINE. — En employant le procédé de A. Jolles on trouve comme quantité moyenne de bilirubine 0,25 pour 100 ; c'est-à-dire, une proportion assez forte pour donner la couleur rouge en solution alcaline.

Diluée, cette bile présente une couleur jaunâtre ambré.

A cette bile diluée on peut appliquer tous les moyens d'oxydation, l'action de la lumière, de la chaleur, de l'iode alcoolique, de l'eau chlorée, de l'eau iodée. On obtient les mêmes résultats qu'avec la bile de veau.

Expérience. — Bile de porc, 1 centimètre cube ; eau distillée 5 centimètres cubes. La couleur du mélange est jaune ambré.

1 centimètre cube de bile diluée traitée par 0 div. 5 d'iode alcoolique prend une couleur verdâtre.

1 centimètre cube de bile diluée traitée par 0 div. 9 d'iode alcoolique devient vert, (la couleur devient rouge par la soude, verte par l'acide acétique) biliprasine.

1 centimètre cube de bile diluée traitée par 1 div. d'iode alcoolique devient vert foncé ; cette couleur n'est pas modifiée par la soude ni l'acide acétique.

1 centimètre cube de bile diluée traitée par 1 div. 5 d'iode alcoolique devient bleuâtre.

Il est avantageux d'employer la bile diluée, au lieu de bile pure. On obtient facilement ces produits.

La réaction de Gmelin réussit mal avec la bile pure.

Même en usant de grandes précautions pour verser la bile sur l'acide nitrique-nitreux, on voit se former des mélanges partiels, des masses liquides irrégulières présentant les diverses couleurs habituelles : le vert, le bleu, le violet, le jaune. Cet effet est dû à l'existence d'une grande quantité de pseudo-mucine qui se précipite et mélange les couches.

En diluant la bile de porc, la réaction de Gmelin se produit aussi bien qu'avec la bile de veau.

Sous l'action de la laccase la bile diluée verdit, même à l'obscurité.

Avec l'eau oxygénée, il se produit un verdissement et un dégagement abondant ; tandis qu'avec la bile bouillie il n'y a pas de dégagement.

PIGMENT INTERMÉDIAIRE. — La couleur rouge est due aux bilirubinales alcalins qui constituent la dominante. Il y a néanmoins une certaine quantité de pigment jaune bili-prasinale de sodium.

En effet, en ajoutant de l'acide acétique glacial, la liqueur devient vert clair, puis vert foncé.

D'ordinaire, il faut observer quelques précautions, pour réussir cette expérience, il faut agir sur la bile étendue d'eau et bien régler l'addition d'acide acétique. La bile de porc est en effet extrêmement riche en substances précipitées par l'acide acétique et particulièrement en pseudomucine. Il se produit donc, dès l'arrivée des premières gouttes d'acide acétique, un abondant précipité qui masque les autres changements. Mais, d'autre part, nous savons que la pseudomucine biliaire est soluble dans un excès d'acide acétique (caractère qui la distingue de la vraie mucine). On continuera donc à ajouter de l'acide

acétique jusqu'au moment précis de la disparition du précipité. A ce moment on apercevra le virage au vert. L'addition ultérieure de soude ramènera la couleur jaune.

ACTION DE L'ACIDE CARBONIQUE. — Si l'on fait arriver dans la bile diluée du porc un courant d'acide carbonique, la couleur rouge se change en vert clair ; c'est la biliprasine, qui se caractérise par le rougissement avec la soude et le reverdissement avec l'acide *acétique*.

Un mot, maintenant, sur le dépôt obtenu en filtrant la bile de porc naturelle. Ce dépôt est de couleur jaune-rougeâtre. Il est formé de bilirubinate qui n'a pu rester en solution et de bilirubine libre, l'alcalinité n'étant pas suffisante pour salifier cette bilirubine. La preuve de ce que nous avançons, c'est que ce dépôt traité par le chloroforme directement colore celui-ci assez nettement.

La bile de porc, sous l'influence de l'oxygène de l'air, de la lumière, de la chaleur, devient verte par transformation des bilirubines en biliverdines. Abandonnée à elle-même, cette bile verte s'altère sous des influences microbiennes et retourne au jaune rouge. Ce sont les mêmes phénomènes observés déjà avec la bile de veau.

Seulement la transformation ici semble plus active. Une culture sur gélatine faite avec la bile de porc de 4 jours, liquéfie rapidement cette gélatine.

c) **Bile de chien.** — La bile de la vésicule, chez le chien, se place au point de vue de la quantité de bilirubine qu'elle contient entre la bile de veau et celle de porc. Jaune rouge dans les canaux biliaires, elle prend une teinte composée vert sombre et jaune rouge dans la vésicule.

Pour apercevoir nettement les transformations des pigments biliaires, il ne faut pas opérer sur la bile normale, qui est trop concentrée et dont les teintes rouge, jaune et

verte se mélangent et se masquent réciproquement. Il faut opérer sur la bile diluée, par exemple sur le mélange suivant : bile 1 partie, eau distillée 4 parties.

Cette bile diluée est d'une couleur jaune paille vif. A l'air et à l'obscurité, elle ne change pas. Mais à la lumière et à l'air, elle verdit ; de même, sous l'action de la chaleur.

L'influence de la réaction se fait également sentir. Si l'on chauffe à 75° à l'air et à l'obscurité, pendant 1 heure, la bile normale diluée, on n'observe pas de changement notable ; ce n'est qu'en prolongeant la chauffe qu'on aurait une variation de teinte. Mais, si au lieu de bile normale légèrement alcaline, on emploie la bile diluée neutralisée ou légèrement acide, le verdissement, c'est-à-dire l'oxydation, se trouve facilitée ; le chauffage d'une heure suffit.

EXISTENCE DU STADE INTERMÉDIAIRE BILIPRASINIQUE. — La bile du chien renferme surtout le pigment bilirubinique. Le pigment intermédiaire biliprasinique y existe cependant abondamment ; il s'y forme facilement sous les moindres influences.

L'expérience suivante en fournit la preuve.

Expérience. — On met à nu la vésicule biliaire chez un chien (bien portant, alimenté au lait et préparé pour l'opération de la fistule biliaire).

La bile recueillie est de couleur orangé rouge. On l'étend à cinq volumes avec l'eau distillée et on en remplit à moitié hauteur plusieurs tubes à essai.

Ces tubes présentent une coloration jaune rouge et une réaction alcaline. On fait passer dans le tube n° 1 un courant d'acide carbonique. Au bout de 10 minutes le tube est vert, vert foncé.

Pour comparaison, dans le n° 2, on fait passer un courant d'air ; pas de changement au bout d'une heure. Les tubes témoins, 3, 4 exposés à l'air n'ont pas changé.

Ceci posé, on reprend le n° 1, qui est de couleur vert foncé ; on y

ajoute quelques gouttes d'acide acétique glacial, la liqueur passe au vert clair. On traite alors par la solution de soude, la liqueur redevient jaune. On reproduit encore une fois, avec la même liqueur, les virages du jaune au vert et du vert au jaune.

Ces épreuves établissent donc l'existence dans la bile jaune du biliprasinate à côté du bilirubinate. C'est ce biliprasinate qui, sous l'action du courant de CO^2 devient biliprasine (acide biliprasinique) de couleur verte et de nouveau biliprasinate jaune sous l'action de la soude.

On chauffe à 75° , pendant un quart d'heure, la solution acétique verte. La couleur s'accroît. Il se forme un biliverdinate et désormais il sera impossible de revenir au jaune en employant l'alcali. Enfin, dernier caractère appartenant à la biliprasine : la solution verte acétique est jaunée et précipitée par l'action du vide.

Pour montrer d'une autre manière que lorsque l'on a fait passer le courant de CO^2 dans la bile jaune du chien, le verdissement ne peut être attribué à une oxydation par de l'air entraîné (oxydation qui donnerait de la biliverdine), on peut opérer avec une variante :

Expérience. — La bile pure est saturée d'acide carbonique ; l'eau qu'on y mélange à raison de 4 volumes pour 1 de bile est également saturée d'avance d'acide carbonique. On fait barboter CO^2 dans le mélange. Celui-ci devient vert très rapidement.

Comme contre-épreuve le tube témoin où circule l'air n'a pas changé de couleur.

Ces expériences expliquent un phénomène qui a été mal interprété par quelques observateurs.

C'est à savoir que la bile jaune diluée de chien reste jaune dans le vide, tandis qu'elle verdit à l'air. On en a conclu que l'oxygène était indispensable au verdissement de la bile. Ce n'est pas exact ; nous voyons que la bile jaune

verdit sans intervention de l'oxygène, par la seule action de l'acide carbonique.

La biliprasine une fois formée passe facilement à l'état de biliverdine, par déshydratation et oxydation, ou par déshydratation seulement, comme nous l'avons dit déjà.

On peut faire avec la bile de chien diluée les mêmes expériences que l'on fait avec les pigments purs. La bile rendue verte (pigment biliverdinique) peut être ramenée à l'état de bile jaune (bilirubinate) par l'action réductrice de l'hydrogène sulfuré. Dans ce passage, on saisit fort bien la stade biliprasinique si l'on opère avec précaution.

Inversement, les agents oxydants, l'iode alcoolique, l'eau chlorée, bromée, iodée, le chauffage à l'air permettent de passer de la bile rouge du chien à la bile définitivement verte en traversant le stade biliprasinique.

RÉACTION DE GMELIN. — La bile de chien normale donne très mal la réaction de Gmelin à cause de l'abondance de la pseudo-mucine.

Le précipité qui se forme empêche la superposition régulière des couches et amène des mélanges de masses à différents états d'oxydation et de coloration. On évite cet inconvénient en opérant sur la bile diluée. La réaction réussit alors, parfaitement.

EAU OXYGÉNÉE. — La bile de chien contient aussi une substance qui est capable de décomposer instantanément l'eau oxygénée. Dans les deux cas il y a à la fin décoloration.

EXISTENCE D'UN PIGMENT ROUGE. — Par l'action de la chaleur (30° à 75°) la bile de chien non diluée devient rouge.

Wertheimer et Meyer (1) ont observé dans la bile de chien un spectre à 2 bandes : une bande d'absorption dans le rouge à bord net du côté du jaune, estompé du côté du rouge. Pour la bien voir il faut augmenter la concentration de la solution. A côté de cette bande, il existe une seconde bande entre C et D, tout près de D.

Ce spectre correspondrait à celui que Heynsius et Campbell attribuaient à la bilicyanine qui est bleue en milieu acide, verte en milieu alcalin, rouge en solution neutre. La bile rouge, qui résulte de l'action de la chaleur, donne précisément le spectre que nous venons de décrire.

Ce pigment rouge est un produit d'altération : c'est le résultat d'une oxydation poussée sans doute au delà de la biliverdine, la bile du chien s'oxydant facilement à l'air et à la lumière et mieux encore si à ces actions s'ajoute la chaleur. Ce pigment ne doit donc pas être considéré comme un pigment naturel, normal, physiologique. A côté de ce pigment rouge se produit sous les mêmes actions oxydantes, le pigment vert. La couleur du liquide est due au mélange de ces deux pigments vert et rouge, ou à la prédominance de l'un d'eux.

Bile de lapin. — La bile de lapin est ordinairement de couleur vert clair, rarement vert foncé ; cette couleur est due au pigment biliprasinique, comme le montre l'expérience suivante :

Expérience. — On étend la bile à 5 volumes. On traite par quelques gouttes de solution de soude à 30 0/0. La liqueur devient jaune et trouble. On chauffe, la couleur jaune s'accroît et passe au rouge. Le trouble se reproduit par refroidissement.

(1) E, WERTHEIMER et MEYER, De l'apparition de l'oxyhémoglobine dans la bile. *Archives de physiologie*, 1889, p. 441.

On ajoute de l'acide acétique glacial : la liqueur prend la couleur verte. Le virage peut être alternativement répété plusieurs fois.

La liqueur verte, soumise à l'action du vide, passe au jaune, jaune fixe que l'acide ne détruira plus (bilirubinate).

VARIÉTÉS. — Bile blanche. — Quelquefois, mais très rarement, la bile de la vésicule est blanche et trouble. Elle est semblable à celle que l'on nomme *bile décolorée*, dont les pigments ont été déposés. Il faut admettre ici que les pigments ont fait défaut (ce qui montrerait l'indépendance des deux processus qui fournissent l'un les acides biliaires l'autre le pigment) ou que le pigment biliaire aurait été oxydé jusqu'à décoloration (ce qui est moins vraisemblable, quoique possible). La réaction de cette bile est alcaline. L'action des oxydants ou des réducteurs n'y change rien.

Bile de cobaye. — Elle est ordinairement de couleur vert clair, elle ressemble à celle du lapin ; d'autres fois la bile est jaunâtre ; chez le cobaye les biles blanches sont plus rares que chez le lapin. Comme chez le lapin, la bile verte du cobaye devient jaune par la soude et retourne au vert par l'acide acétique. La couleur est due à la biliprasine.

Oiseaux.

Bile de poulet. — La vésicule est colorée en vert : pourtant la bile qu'elle contient est rouge jaune ; elle est trouble ; elle ressemble par sa couleur à celle du chien et du porc ; sa teneur en bilirubine est inférieure à celle du chien. Elle doit sa couleur jaune aux biliprasinates comme le prouve l'expérience suivante :

Expérience. — La bile est diluée avec 4 fois son volume d'eau, la réaction est légèrement acide.

L'alcali clarifie la liqueur et dilue sa teinte qui de rouge sombre devient rouge clair ; l'acide acétique glacial la fait passer au vert émeraude, rapidement. Avec le même tube, on peut répéter plusieurs fois les mêmes alternatives.

Examinons l'action des agents oxydants.

1° IODE ALCOOLIQUE. — La bile diluée traitée par l'iode alcoolique avec précaution devient d'abord vert clair (acide biliprasinique) redevenant rouge par la soude et retournant au vert par l'acide acétique.

L'excès d'iode alcoolique change le pigment jaune en pigment vert définitif, en biliverdine, qui ne donne plus la réaction alcalino-acide. En poussant plus loin l'action, la couleur passe au violet, au bleu, et enfin au jaune (cholétéline).

2° RÉACTION DE GMELIN. — Avec la bile diluée la réaction est très nette ; les diverses couleurs se distinguent très bien et le passage d'une couleur à l'autre se fait moins vite que dans d'autres biles.

3° SELS DE MANGANÈSE. — Avec le chlorure de manganèse, la bile devient trouble par la formation d'un précipité qui masque la couleur verte. La filtration montre la coloration verte du liquide, que la soude ramène au rouge (avec précipité) et l'acide acétique glacial au vert. En prolongeant l'action, on obtient les teintes vert foncé et bleue (bilicyanine).

Par l'acide carbonique on obtient les 2 teintes vert clair et vert foncé. L'hydrogène sulfuré ramène le vert au rouge (bilirubinate.)

La bile du poulet contient aussi la substance qui décompose l'eau oxygénée et qui est détruite par la chaleur ; la bile bouillie ne décompose plus vivement l'eau oxygénée.

Reptiles.

Tortue. — La tortue possède un foie très volumineux ; la vésicule biliaire présente la couleur verte ; mais la bile est de couleur jaune-brun. On s'assure facilement au moyen de la réaction alcalino-acide que cette couleur est due au biliprasinate de sodium.

La réaction de Gmelin se produit très facilement.

Batraciens.

Grenouilles. — On doit recueillir les vésicules biliaires d'un assez grand nombre d'animaux. Il faut environ 40 vésicules biliaires pour avoir 1/4 de centimètre cube. La couleur de la bile est verte ; elle est assez intense pour qu'il y ait intérêt à la diluer au cinquième.

Cette couleur est due à la biliprasine, la soude à 30 0/0 fait virer la liqueur au rouge et l'acide au vert ; le vide fait passer le vert au jaune.

Elle contient très peu de bilirubine libre ; avec le chloroforme, celui-ci reste presque incolore.

Par l'iode alcoolique, l'eau chlorée, bromée, etc., le pigment passe au vert foncé.

L'eau oxygénée se décompose et la bile se colore en vert foncé ; puis la décoloration arrive.

La réaction de Gmelin est très nette.

L'action de la chaleur à 75° pendant une heure fait passer la bile au rouge. C'est ce pigment rouge qui existe en grande quantité chez le crapaud (Adduco).

DEUXIÈME PARTIE

FER HÉPATIQUE.

Le foie des animaux, en général (organe hépatique, hépato-pancréas), remplit une fonction spéciale relativement au fer de l'organisme. — C'est l'organe ferrugineux par excellence. Il fixe des quantités de fer considérables, par rapport à toutes les autres parties de l'économie. Cette teneur en fer est indépendante des circonstances extérieures ; elle ne suit pas les variations de la richesse en fer du milieu ambiant ; elle n'est pas influencée davantage par les variations les plus étendues du fer alimentaire (jeûne, hibernation). Elle l'est, au contraire, par les conditions physiologiques qui la font varier entre des limites assez écartées.

Le fer hépatique n'est donc pas un élément accidentel, dont l'existence dans le foie serait la simple conséquence de sa présence banale dans le milieu extérieur. Il résulte d'une intervention vitale et est destiné à exercer une action physiologique. Il subvient, en cas de besoins, aux dépenses et à la disette du reste de l'organisme. Enfin il est destiné à s'éliminer partiellement par la sécrétion externe¹⁸¹ du foie (bile, liquide hépato-pancréatique).

Ces faits établissent l'existence d'un mécanisme physiologique qui exige un nom approprié et réclame une étude

spéciale. C'est ce que nous avons appelé la *fonction martiale du foie*.

En ce qui concerne les invertébrés, les faits sont entièrement nouveaux. A notre connaissance, l'on n'avait pas essayé de déterminer quantitativement et par des méthodes rigoureuses la teneur en fer des différents organes, et l'on n'avait pu suivre les variations de ce métal dans le foie. D'ailleurs, les procédés dont dispose la chimie ne permettaient pas cette étude. Nous-mêmes nous n'avons pu l'aborder que grâce au procédé de Lapique, que l'auteur a mis en usage dans notre laboratoire de la Sorbonne.

En ce qui concerne les vertébrés, un grand nombre de très habiles chimistes, tels que Maly, Hoppe-Seyler, Quincke, Stockmann et Grey, Gottlieb, Krüger, Nasse, Damaskin, Dieltz, Socin, Hamburger, Zaleski, Jacoby, Bunge, L. Lapique, Ausscher et Guillemonat, pour ne citer que quelques-uns parmi les auteurs les plus récents, ont consacré leurs soins à l'étude des mutations du fer chez l'homme et chez quelques mammifères. Mais, chez ces animaux, la *fonction martiale* du foie est précisément primée et défigurée par une autre fonction qui vient s'y superposer dans le même organe, à savoir la *fonction hématolytique*. Les auteurs ont bien observé que le foie était riche en fer ; mais il l'est incomparablement moins que le sang lui-même, et dans quelques circonstances il ne l'est pas plus que la rate. On a encore observé le fait intéressant, et sur lequel Bunge a beaucoup insisté, de l'extrême richesse du foie en fer au moment de la naissance. L. Lapique a bien montré que ce phénomène n'est pas aussi constant qu'on l'avait cru. Il a fait voir que les variations de la teneur en fer du foie sont très lentes, qu'elles ne sont pas influencées, par conséquent, par l'alimentation ou par

le jeûné ; qu'elles le sont, au contraire, par la croissance, par le sexe et par les états pathologiques ou les accidents qui retentissent sur le sang.

Mais, toutes ces très précieuses connaissances, loin de mettre en évidence la *fonction martiale* du foie, étaient faites au contraire pour la dissimuler. Elles mettaient en lumière la fonction du foie par rapport au sang, dont le fer est un élément essentiel.

Le sang des invertébrés ne contient pas sensiblement de fer, qui y est fréquemment remplacé par le cuivre (hémocyanine). La rate n'existe pas ; le foie est donc l'organe martial par excellence et par exclusion. Au contraire, chez les vertébrés, c'est le sang qui est de beaucoup la partie la plus riche en fer. Le fer y est lié à la matière colorante rouge, à l'hémoglobine. Le foie arrive en seconde ligne, ou même en troisième, après la rate. Le fer du foie a donc été subordonné à celui du sang. On a dit qu'il était dans le foie par le sang et pour le sang. On enseigne qu'il se produit dans le foie une destruction des globules (hématolyse) ou tout au moins un remaniement de leur matière colorante, l'hémoglobine, dont le terme définitif est le dépôt sur place du fer de la molécule hémoglobine et la formation des pigments de la bile aux dépens des éléments restants de cette molécule. Le dépôt hépatique est une réserve où l'organisme semble puiser pour constituer le fer circulant ou le reconstituer à la suite de grandes pertes (hémorrhagies profuses). On voit alors, en effet, le dépôt hépatique subir une forte diminution.

Ce sont là des faits qui intéressent au plus haut degré la physiologie. Ils font apercevoir une relation entre le fonctionnement du foie et l'évolution du sang ; ils établissent un lien qui rattache au pigment sanguin les pigments

biliaires, et par ceux-ci, ultérieurement, les pigments urinaires. Mais, par compensation, ces utiles notions ont eu deux conséquences fâcheuses. La première, c'est qu'elles ont détourné de chercher au fer hépatique, ou tout au moins à une partie de ce fer, un autre rôle que celui qui s'offrait avec tant d'évidence, c'est-à-dire le rôle de témoin des mutations de l'hémoglobine et de réserve pour la reconstitution de ce pigment sanguin. Ce que l'on apprenait de la fonction hématique du foie dissimulait la fonction martiale proprement dite.

En second lieu, ces notions ne se prêtaient pas à une généralisation étendue. Si la source unique et avérée du fer hépatique est le pigment sanguin hémoglobine, les phénomènes doivent se restreindre aux vertébrés. Il n'y aura pas lieu d'entreprendre des recherches analogues chez les invertébrés chez qui, en règle générale, l'hémoglobine et le fer font ordinairement défaut et se trouvent souvent remplacés par un pigment cuprique, tel que l'hémocyanine.

Les circonstances nous ont amenés à douter de la fonction hématolytique du foie, ou, pour parler plus exactement, de ce qu'il y a d'excessif et d'absolu dans cette doctrine. Nous avons été amenés à douter, en particulier, que la formation du pigment biliaire fût une simple conséquence des mutations du pigment sanguin.

Dès lors, libérés des entraves de la théorie régnante, nous avons pu rechercher le fer dans le foie des invertébrés, et nous l'y avons en effet trouvé avec un caractère encore plus exclusif que chez les vertébrés. Et en ce qui concerne le pigment biliaire, on voit se former chez l'escargot au sang cuprique, et par conséquent indépendamment de tout pigment sanguin ferrugineux, un pigment

biliaire, l'*hélicorubine*, à peu près identique à la bilirubine des mammifères. Le rôle martial du foie apparaît ainsi à nu chez les invertébrés, tandis que chez les vertébrés il est masqué par le rôle *hématique* du même organe, au point qu'il est difficile de faire la part de l'un et de l'autre.

Méthode employée pour la détermination quantitative du fer.

Toutes nos déterminations du fer du foie et des tissus ont été exécutées au moyen du procédé de Lapique (1), fondé sur la colorimétrie du sulfocyanate ferrique. Ce procédé est parfaitement adapté aux recherches biologiques à cause de sa commodité et de sa rapidité et surtout à cause des faibles quantités de matière qu'il exige et dont ne s'accommoderaient pas les méthodes par pesée ou les méthodes volumétriques ordinaires. Si l'on observe dans l'exécution les précautions prescrites, les déterminations offrent toute sécurité. L'étude préliminaire critique et expérimentale faite par l'auteur, les comparaisons avec la méthode volumétrique de Margueritte ou la méthode par pesée ont mis en évidence la sûreté des déterminations et par conséquent la confiance qu'elles méritent.

Rappelons en deux mots la manière d'opérer :

Pesée de l'échantillon à analyser. — On prend 10 grammes de foie frais ou 2 grammes de poudre desséchée jusqu'à constance du poids. S'il s'agit d'un animal à sang rouge et ferrugineux (vertébrés) on aura eu soin d'hydrotomiser le tissu par un lavage à l'eau salée physiologique afin d'enlever tout le sang et par conséquent tout le fer du sang qui viendrait fausser la recherche.

(1) L. LAPIQUE, Observations et expériences sur les mutations du fer chez les vertébrés (*Thèse de la Faculté des sciences*. Paris, 1897, p. 15).

Ces poids, 10 grammes de tissu frais exsangue et 2 grammes de tissu sec, sont choisis (*à posteriori*) après tâtonnements, parce que la quantité la plus convenable au dosage est de 1 milligramme de fer et que c'est précisément celle qui est contenue en moyenne dans 10 grammes de foie frais.

S'il s'agit d'un autre tissu, l'expérience apprend qu'il faut en prélever une quantité plus considérable, cinq à six fois supérieure, au moins ; par exemple, 40 à 50 grammes de tissu frais, ou 8 à 10 grammes de tissu sec.

Préparation de la liqueur colorimétrique. — Cette quantité de tissu est incinérée par un procédé particulier. La calcination ne convient pas, parce qu'elle est longue et très délicate, si l'on veut éviter de volatiliser le fer à l'état de chlorure ou de l'insolubiliser en calcinant trop fortement l'oxyde.

On détruit la matière organique par l'acide azotique au sein d'une petite quantité d'acide sulfurique dans le récipient même où se fait la pesée du tissu. Le tissu frais ou sec est donc introduit dans un ballon de verre de Bohême de 125 centimètres cubes de capacité, préalablement taré. On pèse par différence le tissu introduit. On ajoute de l'acide sulfurique pur, bien exempt de fer, environ 1 centimètre cube d'acide par gramme de tissu frais, c'est-à-dire dans le cas présent 8 à 10 centimètres cubes, et on laisse macérer à froid pendant environ quatre heures.

Cette macération préalable n'est nécessaire ou simplement utile que pour ralentir la violence de l'action et les projections ultérieures qui pourraient se produire au moment où l'on chauffera.

Si l'on opère sur le tissu sec au lieu du tissu frais, on peut s'en dispenser, et l'on procédera immédiatement aux opérations suivantes :

Dans une hotte vitrée, d'où le fer est exclu ou dont la surface est protégée par une épaisse peinture, on place les ballons dans une position inclinée sur un support de cuivre au-dessus d'un bec de gaz et l'on conduit la chauffe avec précaution, ralentissant la flamme de manière à éviter les projections. La matière organique se dissout. A la fin de l'opération, on pousse la flamme de manière à éliminer l'eau et à amener l'acide sulfurique près de son point d'ébullition, ce dont on est averti par la disparition des épaisses vapeurs blan-

châtres qui chargeaient l'atmosphère du ballon, maintenant transparente.

On écarte alors le ballon du feu : on le laisse refroidir un peu et on y fait tomber, au moyen d'un flacon compte-gouttes, de l'acide azotique pur exempt de fer et on agite. Le contenu du ballon qui était noirâtre et ses parois qui étaient mouchetées d'éclaboussures noirâtres se décolorent et passent au rouge clair, en même temps qu'il se dégage des vapeurs nitreuses.

On chauffe de nouveau et on recommence les mêmes opérations jusqu'à ce que les parois soient propres et la liqueur claire et légèrement colorée en jaune verdâtre. Il est bien entendu que l'on rajoute au besoin de l'acide sulfurique au cours de l'opération, s'il diminuait par trop par suite de la volatilisation. A la fin, au contraire, on poussera la chauffe s'il était en excès. Il faut s'arranger de manière que la quantité finale de liquide ne dépasse pas sensiblement 2 centimètres cubes. Le fer s'y trouve au fond sous l'apparence d'une fine poudre cristalline (sulfate ferrique), dont l'abondance fournit à première vue, à l'observateur exercé, une première idée de la richesse en fer du tissu. Avec beaucoup de précautions, on ajoute ensuite de l'eau, environ 20 centimètres cubes, on fait bouillir jusqu'à dissolution complète du précipité cristallin. On laisse refroidir. On a alors une liqueur claire pâle, jaune verdâtre, prête pour la colorimétrie.

Solution d'analyse et solution type. — On a une petite fiole dont le long col porte deux traits de jauge correspondant à 20 centimètres cubes et 25 centimètres cubes. On verse dans cette fiole la liqueur précédente provenant de l'incinération azoto-sulfurique, et avec les rinçures successives d'eau distillée du ballon, on amène le volume au trait 20 centimètres cubes. On ajoute à cette liqueur d'analyse (jusqu'au trait 25 centimètres cubes) 5 centimètres cubes d'une solution à 10 0/0 de sulfocyanate d'ammoniaque. On agite. On obtient ainsi une solution rouge. C'est cette *solution d'analyse* qui devra être comparée à la *solution type* dans le colorimètre Laurent. Le résultat de la comparaison fera connaître les richesses relatives des deux solutions, et comme on connaît celle de la solution type, on aura la valeur absolue de l'autre.

La *solution type* est obtenue en dissolvant à chaud 0 gr. 500 de fil d'archal bien décapé dans de l'eau distillée additionnée d'acide sulfu-

rique pur, en excès, et d'acide azotique. L'ébullition est continuée pendant une demi-heure. Après refroidissement, on étend à 1 litre, 20 centimètres cubes de cette liqueur contiennent 1 centigramme de fer. Si l'on ajoute à cette liqueur 5 centimètres cubes de sulfocyanate d'ammoniaque à 10 0/0, on a une coloration d'un rouge très intense.

Ce n'est pas cette solution elle-même que l'on emploie. Celle-ci sert seulement de solution-mère. On en prend une portion que l'on étend au 10°, et qui, par conséquent, contient dans 20 centimètres cubes 1 milligramme de fer. Elle est la véritable solution type.

On possède ainsi les deux solutions rouges à comparer : la solution d'analyse, la solution type. Sous même volume, la teinte est proportionnelle à la richesse en fer. La comparaison des teintes se fait dans le colorimètre Laurent avec des précautions que nous n'avons pas à décrire ici. Nous renvoyons au travail de M. Lapicque (p. 30 et suiv.).

Comparaison colorimétrique. — Pour éviter toute erreur relative aux différences d'éclairage, on ne compare pas directement les deux liqueurs entre elles. Mais on les compare toutes les deux à un même étalon de couleur fixe, placé d'un côté de l'appareil, tandis que les deux liqueurs sont successivement placées de l'autre côté, dans le godet. On fait mouvoir le manchon vide, c'est-à-dire varier l'épaisseur sous laquelle on examine la liqueur, jusqu'à ce que sa teinte soit exactement celle de l'étalon. On lit cette épaisseur e' , au demi-millimètre près au moyen du vernier.

On lit de même l'épaisseur e correspondant à la solution type. La quantité de matière colorante, de substance active, la quantité de fer, sera la même dans l'épaisseur e de solution type et dans l'épaisseur e' de solution à analyser, si l'on admet ce qui est la base du procédé colorimétrique que l'égalité de teinte entraîne l'égalité de teneur en substance active.

Soit p la quantité pondérable de fer contenue dans l'unité de volume (1 litre) de la solution type ; p' la quantité dans l'unité de volume de la solution à analyser. Le cylindre du colorimètre de base B , de hauteur e , de volume $B \times e$ contiendra donc $B \times e \times p$ de fer, pour la solution type ; le même cylindre de base B , de hauteur e' , contiendra $B \times e' \times p'$ pour la solution à analyser. A l'égalité de teinte

ces deux quantités sont égales, $B \times e \times p = B \times e' \times p'$. — D'où $p' = p \frac{e}{e'}$. Pour avoir la quantité de fer contenue dans un volume donné de la solution à analyser, il faut multiplier la quantité contenue dans le même volume de solution type par le rapport colorimétrique $\frac{e}{e'}$. — Appliquons cela au volume 20 centimètres cubes. — Le poids de fer contenu dans 20 centimètres cubes de la liqueur à analyser (c'est précisément tout le fer de l'échantillon analysé qui pesait K grammes), c'est la quantité que l'on cherche x ; le poids de fer contenu dans 20 centimètres cubes de la solution type, c'est 1 milligramme comme nous l'avons vu. — On a donc :

$$x \text{ quantité de fer dans le poids K gr. de tissu} = \frac{e}{e'} \times 1 \text{ milligr.}$$

Le rapport colorimétrique exprime donc en milligrammes le poids de fer contenu dans l'échantillon à analyser qui pèse K grammes. — En divisant par K on aura le *nombre de milligrammes de fer dans 1 gramme de tissu*. — C'est le nombre $\frac{e}{e'} \frac{1}{K}$ qui exprime le résultat de chaque analyse. Par exemple, on traite un poids $K = 7 \text{ gr. } 50$ de foie de bœuf. On trouve un rapport colorimétrique $\frac{38}{70} = 0,54$. La quantité de fer est $\frac{0,54}{7,5}$, c'est-à-dire 0 milligr. 07 par gramme de foie (1).

(1) Dans son étude préliminaire, Lopicque a fixé les conditions qui rendent la méthode rigoureuse et sensible. En principe, la relation qui lie la quantité de fer à l'intensité de la coloration n'est pas simple; il n'y a point de proportionnalité. Le coefficient d'extinction photométrique varie avec les conditions du milieu: sels, quantité d'eau, nature et quantité de l'acide, influence de l'acide phosphorique; mais il y a des conditions, et ce sont précisément celles du procédé où la coloration est proportionnelle à la quantité de fer.

En second lieu, quant à la sensibilité (qui en principe est aussi très grossière dans les déterminations colorimétriques) elle est ici très bien réalisée. En effet, au lieu d'imposer à l'œil une détermination d'intensité, d'égalité d'intensité, ce à quoi l'œil est inhabile; on lui demande de déterminer une variation de teinte, une égalité de teinte, ce à quoi l'œil est très apte. Et précisément on opère avec une teinte sensible. La solution de sulfocyanate ferrique, à 1/1000^e de fer, que l'on emploie

Quantité de fer de différents tissus chez les mammifères.

Ce procédé, aussi expéditif qu'il est exact, a permis de confirmer et souvent de reviser un grand nombre de déterminations du fer (1) dans les différentes parties de l'organisme. Voici celles qu'il est utile de connaître :

Pour l'ensemble de l'économie la quantité de fer varie de 1 à 2/10.000 du poids sec : 1 gramme de sang contient 0 milligr. 5 de fer ; 1 gramme de foie contient 0 milligr. 15 de fer chez le chien adulte (écarts 0,10-0,25), nourri ou à jeun (15 jours de jeûne). — Chez l'animal à la naissance (0,16-0,50, chiffres élevés avec écart considérable.

Lapin, 1 gramme de foie frais débarrassé de sang contient 0,040 (0,035-0,045). — Lapin de 8 jours 0,1, chiffre élevé indiquant une réserve de fer dans le foie.

Bœuf, on trouve 0 milligr. 06 ; à la naissance 0,9. — Réserve de fer, tombant à 0,1 après un mois, à 3 mois 0,03.

Porc, 0,19. — *Hérisson*, 0 gr. 50 moyenne.

ici a, sous l'épaisseur de 4 centimètres, une teinte orangée qui vire immédiatement du côté du rouge ou du côté du jaune, suivant que la proportion de fer augmente ou diminue. L'étalon de verre type est précisément choisi de cette teinte orangée, et il faut amener par dilution convenable la liqueur à analyser à cette teinte, afin de sensibiliser au maximum la détermination.

(1) Les déterminations du fer n'ont conduit jusqu'ici qu'à un petit nombre de conclusions générales. Elles se résument à ceci :

Le foie des mammifères à la naissance est riche en fer. Ce phénomène constant et marqué chez certaines espèces (lapin) est irrégulier chez d'autres.

Le fer du foie diminue et passe par un minimum au moment de la croissance.

À l'état adulte, le fer du foie varie suivant les espèces et les individus. Les variations chez le même individu sont lentes ; elles sont indépendantes du jeûne et de l'alimentation.

La rate à la naissance est pauvre en fer ; le fer y augmente avec l'âge (L. LAPICQUE, *loc. cit.*, p. 162). La circonstance qui paraît influencer le plus sur le fer du foie, c'est la perte de sang (hémorrhagies profuses).

Chat adulte, 0,06 ; à la naissance 0,20 (0,12-0,32). Pas de réserve de fer dans le foie à la naissance.

Homme adulte (0,09-0,23) ; à la naissance 0,25. — Moins de fer chez la femme que chez l'homme, influence du sexe.

Organes vasculaires, analysés avec leur sang (0,9-0,10).

Rate, analysée avec le sang donne :

Chez l'homme adulte (0,06-0,29 ; 0,46-0,54), fer propre très variable ; chez le fœtus, moyenne 0,16 de fer propre. — *Chien*, à la naissance (0,11-0,30), la rate étant analysée avec son sang ; donc pas de fer propre à la naissance ; adultes (0,30-0,80, chiffres élevés mais très variables). — *Porcelets* de 5 à 8 semaines (0,09-0,20). Pas ou peu de fer propre.

Détermination du fer dans le foie et les tissus des invertébrés.

Nous avons recherché le fer chez les invertébrés où l'organe hépatique est assez bien délimité et assez distinct pour pouvoir être isolé. C'est le cas des mollusques et des crustacés en général. Le procédé que nous employons permet de se contenter à la rigueur d'une faible quantité de tissu, mais encore faut-il que cette quantité corresponde à un milligramme ou à une fraction pas trop faible de milligramme. Dans le cas habituel où un seul foie ne satisfait pas à cette condition, on en rassemble plusieurs, de manière à arriver à une dizaine de grammes de tissu frais.

Une remarque préliminaire s'impose : on peut, comme nous l'avons indiqué, opérer sur le tissu frais. Cette manière de procéder a même des avantages, en ce qui concerne le foie et les tissus des vertébrés supérieurs qui renferment des quantités d'eau à peu près constantes faisant partie de leur constitution. L'évaluation peut et doit alors être faite pour le tissu frais qui est le véritable facteur physiologique. Mais la situation est différente avec les

invertébrés chez lesquels la circulation est lacunaire et où la quantité des sucs intercellulaires peut subir des variations considérables. La quantité d'eau qui, de ce chef, peut être extraite par évaporation prolongée, à 100°, d'un tissu donné, varie entre des limites assez étendues. On peut admettre, comme chez les vertébrés, le coefficient 5 comme indiquant le rapport au poids sec du poids frais réel, propre. Mais ce rapport, en fait, par l'invasion excessive des liquides interstitiels, peut atteindre quelquefois jusqu'à 6 pour le tissu musculaire, le tube digestif. Toutefois il est remarquable que le foie compact contient toujours moins d'eau : le coefficient est 3,8 pour l'escargot ; 2,3 pour le homard.

Pour avoir des déterminations précises nous avons procédé ici comme les chimistes qui cherchent la quantité de fer par rapport au poids sec. Les chiffres que nous donnons pour les mollusques et les crustacés ont été le plus souvent obtenus de cette façon. Quand on veut passer au poids frais, on divise le chiffre trouvé par le facteur constant 5. Ce chiffre est sensiblement inférieur pour le foie : 3,8 est le chiffre réel. Pour les autres tissus 5 est un chiffre moyen. La plupart de nos teneurs rapportées au poids frais de tissus sont ainsi calculées. Mais toujours nous avons pour contrôle, opéré directement quelques déterminations expérimentales en partant du tissu frais.

Mollusques céphalopodes.

Nous avons opéré sur le poulpe vulgaire, la seiche et le calmar.

Poulpe (Octopus vulgaris). — Nous avons fait une dizaine d'analyses de fer du foie (hépatopancréas), chez des poulpes venant de Paimpol en Bretagne et d'autres venant d'Arcachon. L'opération portait

soit sur le tissu frais directement, soit sur le tissu desséché préalablement. Les chiffres, dans ce dernier cas, ont été rapportés au tissu frais. On trouve, en résumé, que la teneur en fer a varié de 0,07 à 0,12 pour 1000 avec une moyenne de 0,09, ou en d'autres termes que 1 gramme de tissu frais de foie de poulpe contient en moyenne 0 milligr. 09 de fer et qu'il peut en contenir jusqu'à 0 milligr. 12.

Si l'on compare ce chiffre à celui de quelques mammifères, on voit qu'il s'en rapproche d'assez près, surtout si l'on tient compte de la différence de la teneur en eau. La teneur moyenne du poids sec 0,52 en est encore plus près. L'écart ne dépasse pas les variations spécifiques que l'on observe chez les mammifères.

Seiche. — Résultats analogues à ceux de la série précédente.

Nous avons comparé la teneur en fer du foie à la teneur en fer d'autres tissus (branchies), etc. Le plus souvent, le fer n'y existe qu'à l'état de trace. Si l'on compare la quantité de fer du foie à celle de l'ensemble du corps, on trouve pour le poids sec des chiffres qui varient dans le rapport de 0,52 à 0,02, c'est-à-dire que le foie contient à poids égal, 25 fois plus de fer que le reste de l'organisme.

C'est presque la même proportion relative que chez la plupart des mammifères où ces déterminations ont été faites.

En résumé, chez les céphalopodes que nous avons examinés, le foie s'est montré un organe riche en fer. Il contient vingt-cinq fois plus de fer à poids égal que le reste du corps. Par là il se rapproche du foie des mammifères. Il est d'ailleurs encore mieux spécialisé, au point de vue du fer, que le foie des mammifères, puisqu'il est le seul organe ferrugineux, tandis que, chez les mammifères, la rate est fréquemment plus riche que le foie.

Lamellibranches.

1° *Huitres.* — Nous avons examiné diverses variétés d'huitres comestibles (30 analyses).

Les résultats ont été suffisamment concordants. Les variations spécifiques ne dépassent pas sensiblement les variations individuelles.

Nous avons trouvé en moyenne 0,040 de fer pour 1000 de poids frais avec des écarts extrêmes d'un tiers de part et d'autre du chiffre moyen (0,028-0,060).

Le foie s'est également montré ici le seul organe ferrugineux. Il contient, à poids égal, environ 5 ou 6 fois plus de fer que le reste de l'organisme.

Par exemple, on opère sur les huîtres portugaises. On sépare le foie du reste du corps. On réunit les foies d'un certain nombre d'huîtres d'un côté et les corps d'autre part. On dessèche. On analyse la poudre de foie sèche et la poudre de tissus. On trouve avec la première : teneur en fer pour 1 gramme de foie sec = 0,110 ; avec les tissus secs, 0,018.

2° *Coquilles Saint-Jacques* (*Pecten Jacobæus*). — Nous avons opéré avec les pectens de la même façon que précédemment. Voici les résultats de 10 analyses : 1 gramme foie sec contient en moyenne 0 millim. 40 : les écarts ont été peu considérables (0,27-0,47).

L'ensemble des tissus (reste du corps) haché et analysé a donné, à poids égal, quatre à cinq fois moins de fer que le foie (1). Dans une expérience nous avons trouvé pour 1 gramme de foie sec, 0 millim. 2 ; pour le reste du corps 0,04.

Même chose chez les moules. La teneur du poids sec est 0 millim. 16 pour 1 gramme de foie sec. Pour le même poids du corps, la quantité de fer est 4, 7 fois moindre.

3° *Gastéropodes*. — Les analyses ont porté sur un grand nombre d'escargots de diverses provenances (*hélix*) et conditions diverses et sur des buccins. Les déterminations ont dépassé une cinquantaine. Les quantités de fer trouvé varient entre des limites assez fixes suivant les espèces.

Chez les buccins le foie à l'état sec a donné 0 millim. 15

(1) La poudre de foie du *pecten* est très hygrométrique. On est obligé de la conserver à l'exsiccateur.

par gramme ; le reste du corps, 0 millim. 016. La proportion de fer du foie, à poids égal, est six fois plus grande que dans le reste du corps.

Les escargots nous ont fourni l'occasion d'un grand nombre de déterminations.

On opère sur un lot d'escargots de même variété, même taille, récoltés au même lieu.

On extrait les foies, on en réunit plusieurs et l'on procède immédiatement à l'analyse si l'on se propose de déterminer la quantité de fer du poids frais. Ordinairement, nous desséchons le tissu et nous analysons le poids sec. Les foies coupés en morceaux sont placés sur une cuvette plate au-dessus de l'acide sulfurique dans l'exsiccateur à vide. Au bout de vingt-quatre heures, le tissu est assez sec pour pouvoir être réduit en poudre. On achève la dessiccation à l'étuve à 110° ; la constance du poids s'obtient en quelques heures.

Cette poudre de foie n'est pas hygrométrique. On n'est pas obligé de la conserver à l'exsiccateur jusqu'au moment où on l'emploie.

Le foie des escargots assez divers sur lesquels nous avons opéré contient une proportion d'eau assez faible par comparaison avec les autres tissus. Toutes nos déterminations oscillent autour du chiffre 3,8 au dixième près. C'est-à-dire qu'il faut multiplier le poids sec par le facteur 3,8 pour avoir le poids frais. Le chiffre 3,8 représente le coefficient d'hydratation.

Pour les autres tissus, muscle, tube digestif, le coefficient est plus élevé et moins constant. On peut adopter pour eux le coefficient 5 pour représenter l'hydratation propre du tissu indépendamment de l'infiltration accidentelle. Lorsqu'on veut y déterminer la quantité de fer, il faut donc opérer sur les tissus frais pour éviter toute cause d'erreur. En ce qui concerne le foie, il est au contraire à peu près indifférent d'opérer sur le tissu frais ou sur le tissu sec.

Voici les résultats. Nous les groupons en deux séries suivant la grandeur des nombres obtenus :

1^{re} série. — Escargots de vigne. Escargots dits de Bourgogne (*H. Pomatia*).

On opère sur cinq lots.

La teneur du foie en fer oscille autour du chiffre moyen 0 milligr. 098

pour 1 gramme de poids sec. On peut prendre le chiffre 0 milligr. 1, qui est fréquent. Pour 1 gramme de poids frais, cette quantité est 0,02.

Les autres tissus pris en bloc donnent pour 1 gramme de poids sec une quantité de fer égale à 0,021 ; soit pour le poids frais 0,004, c'est-à-dire en définitive 5 fois moins que le foie.

2^e série. — Escargots de jardin à coquille jaune pâle (*H. hortensis*, *aspersa*).

Nous trouvons : foie, 0 milligr. 150 pour 1 de poids sec ; 0 milligr. 03 pour 1 de poids frais.

La teneur des autres tissus pour le poids sec est 0,024, soit entre 5 et 6 fois moindre.

En résumé, le foie des escargots contient constamment du fer. Les variations extrêmes sont exprimées par les chiffres 0.100 et 0.150 pour 1 gr. de foie sec. Il n'y a pas (dans nos conditions d'expérience) d'autre organe réellement riche en fer.

La quantité de fer du foie est entre 5 et 6 fois plus considérable que celle du corps tout entier, abstraction faite de la coquille.

Les escargots sur lesquels nous avons opéré étaient au nombre de plusieurs centaines. Ces grands nombres nous ont permis d'établir des catégories dans nos observations. De là quelques remarques intéressantes.

1^o *Influence du régime, du jeûne, de l'hibernation, des circonstances extérieures.* — Nous avons examiné des animaux à la fin de l'été et pendant l'hiver. Ces derniers sont plongés dans le sommeil hibernant ; ils ont sécrété un diaphragme qui les isole dans leur coquille, ils sont soumis par conséquent à un jeûne absolu et prolongé ; leur vie est atténuée. En ce qui concerne le foie, nous y avons trouvé sensiblement la même quantité de fer, peut-être un peu plus grande qu'à l'état actif. La proportion du métal n'est donc que dans une dépendance lointaine du jeûne

et de l'alimentation. Si l'on veut bien remarquer que nous avons examiné des gastéropodes marins ou terrestres, c'est-à-dire dont l'habitat est en général très diversement riche en fer, on concluera que l'influence directe du milieu ambiant, quant à sa teneur en métal, est à peu près indifférente.

2° Influence des conditions physiologiques. Formation des produits génitaux. Formation de la coquille. — Au contraire, nous pensons que la quantité de fer hépatique varie avec certaines conditions intérieures physiologiques. La période de formation des œufs et la période génitale paraissent avoir une influence qui, pour être mise en lumière exige de nouvelles recherches.

De même la formation de la coquille. Nous avons constaté dans un autre travail que la coquille contenait du fer en proportion notable. Et, inversement, chez les hélix à vie active, nous avons trouvé dans le foie une quantité de sels minéraux, de calcium en particulier, en rapport avec ceux qui existent dans la coquille.

Voici dans quelle circonstance et de quelle manière cette observation a été faite :

Expérience. — On traite, comme nous l'avons dit plus haut, le foie par l'acide sulfurique à chaud. A la fin de l'opération, il reste au fond du ballon, dans 1 à 2 centimètres cubes d'acide, des cristaux de sulfate ferrique, dont la quantité, appréciée à simple vue, fournit un premier renseignement sur la quantité de fer que fournira l'analyse colorimétrique.

Or, il nous arrivait, dans nos analyses de foie d'escargot de nous tromper dans cette appréciation. Il y avait beaucoup de cristaux et cependant assez peu de fer. Cette poudre cristalline n'était pas, en effet, uniquement formée de sulfate ferrique. Elle était formée de sels minéraux (sulfates alcalino-terreux) qui ne se dissolvaient pas ensuite dans l'eau.

3° *Sécrétion hépatique. Sa teneur en fer. Ses pigments.* —

Enfin, la sécrétion du foie entraîne du fer. — Il n'est pas facile d'obtenir la sécrétion du foie chez l'escargot, non plus que chez la plupart des mollusques ou des crustacés, parce que cette sécrétion, trop peu abondante pour être recueillie, est d'ailleurs mêlée aux matières alimentaires. Mais l'escargot hibernant se prête à un artifice. Au-dessous du diaphragme sous lequel il s'est clos on trouve en général un anneau noirâtre correspondant à l'évacuation du contenu de l'intestin qui s'est opérée après l'inclusion. L'intestin lui-même, désormais vide, se remplit de la sécrétion (ralentie) du foie qui continue à s'y accumuler.

En ouvrant l'animal, on peut recueillir cette sécrétion hépatique. C'est une masse consistante d'une belle couleur orangée rouge. Ce pigment constitue ce que Krukenberg a appelé l'*hélícorubine*.

Nous avons analysé cette sécrétion hépatique, au point de vue du fer. Elle est très riche. A poids *sec* égal, elle contient deux à trois fois plus de fer que le tissu hépatique lui-même.

Expérience. — On recueille les foies et les sécrétions hépatiques d'une dizaine d'escargots en hibernation depuis un mois et demi. On dessèche.

La poudre de foie sec contient par gramme, 0 mgr. 15 fer.

La poudre de sécrétion hépatique par gramme, 0 mgr. 45 fer, soit trois fois plus.

Mais cette sécrétion de l'animal hibernant peut être considérée comme le *résultat de la concentration de la sécrétion normale*. En tenant compte de ce fait, on peut évaluer à égalité la quantité de fer de la sécrétion normale et celle du tissu du foie à l'état sec. Comme *la bile des mammifères, la bile de l'hélix contient donc une quantité de fer égale à celle du tissu hépatique*.

La question se pose de savoir comment le fer est engagé dans la sécrétion hépatique, s'il est lié au pigment ou s'il en est indépendant, comme chez les mammifères. Pour le moment, nous avons quelque tendance à penser qu'il en est indépendant. Le pigment biliaire de l'invertébré et celui du mammifère ont ici de nombreuses analogies : couleur, solubilité dans les alcalis, etc. Le spectre d'absorption n'est pas le même : l'hélicorubine offre, en outre des deux plages sombres de la bilirubine aux extrémités rouge et violette du spectre deux bandes noires dans le rouge et l'orangé. En outre, pas de réaction de Gmelin.

Ces différences ne doivent pas empêcher d'apercevoir les analogies de la bile des vertébrés avec la sécrétion hépatique de l'hélix, quant à ces deux points essentiels, le pigment et le fer. Or, ce pigment et ce fer, la théorie les fait dériver, chez le vertébré, du pigment sanguin ferrugineux (hémoglobine) ; et nous voyons ici qu'ils sont entièrement indépendants de tout pigment sanguin ferrugineux, puisqu'il n'en existe pas de tel dans le sang pâle de ces mollusques où d'ailleurs, d'après les auteurs, le cuivre tient la place du fer.

Ces constatations sont bien faites pour inspirer quelques doutes sur les théories peut-être trop exclusives qui règnent en physiologie relativement au rôle *hématolytique* du foie et à la *genèse hématique des pigments biliaires*. Chez les invertébrés, le *dépôt métallique du foie est indépendant du pigment métallique du sang* ; le foie contient du fer, le pigment du sang contient du cuivre ; et inversement, des constatations préliminaires nous permettent de dire que si le pigment du sang contient du cuivre, le foie n'en contient pas sensiblement.

On voit, par ce qui précède, que le fer existe dans le foie

et y varie, non pas au hasard des absorptions (auxquelles, d'ailleurs, il est très rebelle), mais pour des causes et en vue d'usages physiologiques réglés, *pour une fonction*.

Cette fonction, ce n'est pas l'hématolyse, elle n'est pas relative au pigment sanguin (invertébrés) ou pas seulement (vertébrés). Quelle est-elle ?

Ici, nous sortons des faits et nous proposerons une hypothèse, sous toutes réserves et d'abord simplement comme un stimulant capable de provoquer des recherches.

Le rôle du fer serait de favoriser les combustions organiques :

1° Nous pensons que, d'une façon générale, le foie est un des organes où les combustions organiques sont les plus intenses et les plus continues. L'un de nous a déjà insisté sur cette vue.

L'ensemble des réactions qui s'accomplissent dans le foie est exothermique. Il s'y produit un dégagement de chaleur considérable et continu ; c'est au sortir du foie que le sang est le plus chaud ; le foie est l'organe dont la température est la plus élevée (1). Laissant de côté les dédoublements, dont la part ne s'élèverait au maximum qu'à 1/7 (d'après A. Gautier lui-même, qui a appelé l'attention sur leur importance), on peut inférer de cette condition thermique du foie que les oxydations y sont prépondérantes. On est confirmé dans cette conclusion par des observations accessoires. L'acide carbonique et l'eau sont les témoins d'oxydations poussées à leur terme ; l'urée, un résultat d'oxydation incomplète de l'albumine. Or, l'urée a son principal foyer de formation dans le foie. L'acide carbonique y est formé abondamment, car, en outre de l'acide

(1) A. DASTRE, art. bile du *Dictionnaire de physiologie* (11, § III).

carbonique qui passé dans le sang, il y en a en quantité considérable dans la bile, à l'état libre ou à l'état de carbonates (au total 56 cc. 1 0/0 de bile d'après Pflüger). Une partie même de l'eau de la bile semble provenir des combustions hépatiques et non pas seulement de la simple filtration de celle qui est contenue dans le sang, car la pression dans les canaux peut dépasser la pression du sang afférent (veine-porte). Enfin, le défaut presque absolu d'oxygène dans la bile, qui est l'un des produits de l'activité hépatique (0,2 0/0 de bile), semble indiquer aussi que cette activité coïncide avec une consommation d'oxygène poussée très loin. Ces arguments et d'autres encore justifient donc notre opinion sur l'activité d'oxydation du foie.

2° D'autre part, en général, les chimistes ont établi que *le fer est un agent oxydant pour les matières organiques.*

En présence des matières organiques, l'oxyde ferrique $\text{Fe}^2\text{O}^3.3\text{H}^2\text{O}$ cède son oxygène et passe à l'état d'oxyde ferreux. L'oxyde ferreux base forte se combine aux acides mêmes faibles, acidalbumine, acide nucléinique, carbonique, et donne des albuminates, nucléinates, carbonates ferreux. On peut donc avoir des sels ferreux, de l'oxyde ferreux.

Or, au contact de l'oxygène du sang comme l'oxygène de l'air, les sels ferreux se transforment spontanément en sels ferriques ; l'oxyde ferreux devient $\text{Fe}^2\text{O}^3.3\text{H}^2\text{O}$, et si l'acide est faible (acide carbonique, acide albumine, acide nucléinique), le sel ferreux (carbonate, albuminate nucléinate, par exemple) se scinde : l'acide faible devient libre parce que la base elle-même (oxyde ferrique) est faible et l'on a finalement de l'oxyde ferrique libre $\text{Fe}^2\text{O}^3.3\text{H}^2\text{O}$.

On se trouve ainsi ramené au point de départ du cycle

et l'opération peut recommencer indéfiniment : cette opération se résume en ceci, que le fer a servi à fixer de l'oxygène sur la matière organique, c'est-à-dire à la combustion organique. Le rôle du fer serait ainsi celui du convoyeur, transporteur d'oxygène.

3° Si nous rapprochons maintenant ces deux catégories de faits, d'une part, *l'abondance des oxydations dans le foie*, de l'autre *le rôle oxydant du fer*, leur relation devient évidente. La fonction du fer hépatique est d'activer les combustions organiques. La *fonction martiale du foie* est une *fonction d'oxydation* (1).

Appendice. — Crustacés.

Nous avons omis, dans ce qui précède, de signaler les résultats obtenus avec les crustacés. Ils concordent avec ceux que nous ont fournis les mollusques.

L'examen a porté sur les écrevisses, langoustes, homards.

D'abord, le sang. Dans 10 grammes d'hémolymphe de homard, nous n'avons pu déceler de fer en quantité sensible, tandis que le foie en contenait 0 mgr. 12 pour 1 gramme de tissu sec. Le foie du homard est chargé d'une matière grasse qui empêche la dessiccation complète. Un foie frais pesant 63 grammes, pèse encore 27 gr. après dessiccation. La teneur en fer est, comme nous venons de dire, à ce moment, 0 mgr. 12 par gramme sec, soit 0 mgr. 04 pour un gramme de foie frais. Le sang n'a que des traces ; de même l'ovaire.

(1) Cette hypothèse reçoit des confirmations de bien des côtés. Nous citerons, par exemple : 1° le pouvoir oxydant du tissu hépatique constaté par Jaquet, Abelous et Biarnès, Spitzer etc., qui ont conduit quelques auteurs à l'idée d'une *oxydase hépatique* ; 2° les transformations des pigments biliaires qui nous ont conduit nous-mêmes à l'idée d'une *oxydase hépatique* passant dans la bile. Enfin G. Bertrand a montré le lien étroit qui réunit quelques oxydases au manganèse. Ici l'oxydase serait liée au fer, voisin par ses propriétés du manganèse.

Le tissu le plus riche, après le foie, est le muscle ; il contient 0 mmgr. 03 par gramme de tissu sec, c'est-à-dire encore 4 fois moins que le tissu hépatique.

Chez l'écrevisse, nous avons trouvé : fer, 0 mmgr. 20 pour 1 gr. de foie sec. Le tissu hépatique se dessèche bien. Il ne contient pas sensiblement de matière huileuse, comme celui du homard. Le reste du corps analysé en bloc a donné 0 mmgr. 05 de fer par gramme sec.

On peut résumer ainsi les notions acquises dans ce chapitre :

1° Chez les crustacés (homard, langouste, écrevisse), l'organe hépatique est riche en fer, et il est seul à l'être.

2° Chez les céphalopodes (poulpe vulgaire, seiche, calmar) l'organe hépatique (hépatopancréas) est riche en fer. Il contient vingt-cinq fois plus de fer, à poids égal, que le reste du corps. Il est mieux spécialisé à ce point de vue que le foie des vertébrés supérieurs, puisqu'il est le seul organe riche en fer, tandis que chez les mammifères le sang est le tissu ferrugineux par excellence et que la rate est fréquemment plus riche que le foie. Ici il n'y a pas de rate et le sang contient du cuivre ;

3° Chez les lamellibranches (huîtres, coquilles Saint-Jacques, moules), l'état de choses est analogue. Le foie contient constamment du fer. Il en contient cinq à six fois plus à poids égal et à l'état sec que le reste du corps, chez les huîtres ; quatre à cinq fois plus chez les pectens ; cinq fois chez les moules ;

4° Chez les gastéropodes, résultats analogues. Pas d'autre organe réellement riche en fer que le foie. La quantité de fer du foie est entre cinq et six fois plus considérable que celle du corps à poids égal ;

5° La proportion du fer du foie est indépendante du jeûne

et de l'alimentation, de la richesse en métal du milieu ambiant, de l'habitat terrestre ou marin, c'est-à-dire, en général, de toutes les circonstances extérieures et contingentes ;

6° Elle paraît dépendre, au contraire, des conditions physiologiques : 1° en premier lieu la période génitale et de formation des œufs, mais ce point exige de nouvelles recherches : 2° en second lieu la formation de la coquille chez l'escargot. Nous avons vu, en effet, que la coquille contient de fortes proportions de fer et les mêmes pigments qui existent dans le tissu hépatique et inversement le foie renferme, à la période de croissance, des quantités notables de métaux alcalino-terreux ; 3° enfin et surtout, le fer hépatique passe dans la sécrétion du foie. Chez l'escargot en hibernation, on peut obtenir la sécrétion hépatique pure. On s'assure qu'elle contient à l'état sec du fer en proportion au moins égale à celle du tissu hépatique, comme chez les mammifères. Elle contient un pigment remarquable, plus ou moins analogue à l'hématine réduite des mammifères (*hélicorubine*, de Krukenberg) ;

7° Ces faits établissent que le foie possède *une fonction martiale*.

Le fer qu'il contient n'y est pas accumulé au hasard des absorptions et des circonstances extérieures, il y existe et il y varie par des causes et pour des usages physiologiques réglés, pour une *fonction*.

Cette fonction n'est pas relative à l'*Hématolyse*. *Le métal du foie est indépendant du pigment métallique du sang.*

Le pigment biliaire n'a pas son origine dans le pigment sanguin.

Cette conclusion rigoureuse chez les invertébrés n'est sans doute que relative chez les vertébrés, c'est-à-dire

que chez eux, à la *fonction martiale générale* du foie, vient s'ajouter probablement la *fonction hémolytique*.

Les faits s'arrêtent ici. Nous savons que la fonction existe ; nous savons ce qu'elle n'est pas. Quant à ce qu'elle est, nous avons rendu vraisemblable cette *hypothèse*, à savoir :

8° La *fonction martiale* du foie serait une *fonction d'oxydation*.

TROISIÈME PARTIE

PIGMENTS DU TISSU HÉPATIQUE.

1. — L'organe hépatique (foie, hépato-pancréas) présente des variétés anatomiques et physiologiques considérables chez les différents animaux, mais chez tous il offre ce caractère constant d'être *coloré* et sa *couleur*, partout au moins où l'organe est bien caractérisé, est toujours *jaune brun* ou *verte*.

Nous appelons *pigments hépatiques*, les matières qui colorent ainsi le foie.

Ce fait de l'existence universelle de pigments hépatiques est d'autant plus remarquable qu'il est en quelque sorte spécial à l'organe. La sécrétion hépatique n'est pas toujours colorée; il n'y a pas toujours de *pigments biliaires*.

On doit donc retenir, pour la définition de l'organe hépatique, ce caractère de l'existence constante de *pigments hépatiques*, opposé à l'inconstance des *pigments biliaires*.

2. Inconstance des pigments de la sécrétion hépatique. — **Pigments biliaires.** — Chez les invertébrés, mollusques, arthropodes, la sécrétion du foie est souvent incolore. Mais il s'en faut qu'il en soit toujours ainsi, malgré l'opinion commune. C'est à tort que Bunge assure que les seuls vertébrés possèdent une bile colorée. — Beaucoup d'invertébrés ont une sécrétion hépatique colorée : des mollusques en particulier, des crustacés (et nous lais-

sons de côté beaucoup de vers dont les diverticules hépatiques sont remplis d'un liquide nettement teinté, comme les *siphonostoma*, les *spirographis*, chez lesquels ce liquide est vert, comme le sang lui-même). Ce qui fait que cette teinte échappe souvent à l'observateur, c'est que la sécrétion est peu abondante et d'ailleurs masquée par les aliments qui remplissent le tube digestif.

3. Indépendance des pigments hépatiques, d'avec les pigments biliaires. — Les pigments du tissu hépatique ne sont pas nécessairement dépendants de ceux qui colorent la bile. C'est quelquefois à tort, comme nous le verrons au cours de ce travail, que certains zoologistes, dans l'impuissance de se procurer une quantité de sécrétion hépatique suffisante pour l'étude, ont cru obtenir en faisant macérer le tissu du foie un liquide identique à la sécrétion. Les physiologistes savent qu'au moins chez les animaux vertébrés la sécrétion du foie, pas plus que celle du rein, ne peuvent être obtenues par ce moyen qui convient au contraire pour d'autres glandes, en tubes et en grappes.

Il faudra donc des procédés spéciaux pour extraire les pigments hépatiques, chez les vertébrés. Chez les invertébrés où le foie est une glande en tube, la macération au contraire pourra donner une liqueur analogue à la sécrétion.

Nous avons examiné les pigments hépatiques chez un grand nombre de vertébrés et d'invertébrés, au point de vue de leur séparation, de leurs propriétés, spectroscopiques et autres, de leur teneur en fer — de leurs rapports avec les pigments sanguins et avec les pigments biliaires, lorsque ceux-ci existent.

Sur un petit nombre de ces points nous nous sommes rencontré avec les auteurs qui, à notre connaissance,

ont traité de ces questions, Sorby, Krukenberg, Mac Munn, Schmiedeberg et Marfori, Zaleski, Lapicque. Nous aurons soin de citer leurs résultats à côté des nôtres, lorsque l'occasion s'en présentera.

§ 1. — Pigments hépatiques chez les vertébrés.

Nous avons recherché d'abord les pigments hépatiques chez les vertébrés en prenant pour type le chien et en faisant ensuite des comparaisons avec le lézard, la grenouille, la tortue, les poissons.

4. **Moyen d'isoler les pigments.** — Le foie des vertébrés présente une teinte variant du rouge brun au rouge acajou. Cette teinte résulte d'un mélange de la couleur propre du tissu hépatique avec la couleur du sang qui l'imprègne.

La première cliose à faire est de se débarrasser du sang par une opération souvent pratiquée en physiologie dans des buts très divers : *le lavage du foie*.

Cette opération consiste à faire passer dans les vaisseaux du foie la solution physiologique de NaCl (7-9 grammes pour 1000) de manière à entraîner tout le sang qui gorgait les vaisseaux.

La pratique est bien connue : On tue l'animal (chien); on ouvre rapidement l'abdomen et l'on place dans le bout hépatique de la veine porte la canule terminale d'un tube allant au flacon de Mariotte plein de la solution physiologique. La hauteur de celui-ci est réglée de manière que l'écoulement se fasse sous une pression de 50 centimètres d'eau distillée. Le liquide introduit s'écoule par une veine préparée à cet effet, veine cave, veine axillaire, veine jugulaire. On règle le lavage de manière qu'il se prolonge assez longtemps pour être complet, soit une heure. La quantité de solution employée pourra être de 15 à 20 litres.

A mesure que le sang disparaît, la couleur de l'organe s'éclaircit et le tissu prend une teinte fauve.

On laisse revenir sur lui-même le foie distendu par l'excès de liquide ; on l'y aide au besoin en exerçant des pressions ménagées.

La couleur du tissu hépatique est due à des matières qui imprègnent et teignent les éléments anatomiques. Ce sont ces matières colorantes, que nous nommons *pigments hépatiques* et que nous devons essayer d'isoler.

Nous verrons que ces pigments sont au nombre de deux, ou sont tout au moins incorporés à deux ordres de substances qui se distinguent par leur solubilité. Une des catégories de pigments est soluble dans l'eau ; l'autre est soluble dans le chloroforme et l'alcool.

Le *pigment aqueux* ne peut pas être obtenu directement ; moins encore le *pigment chloroformique*. Le tissu hépatique même très divisé n'abandonne à peu près rien à l'eau pure ; il n'abandonne rien à l'alcool. Il faut donc user d'un artifice.

La matière colorante est incorporée au contenu cellulaire. Il faudrait donc, en quelque sorte, détruire isolément chaque cellule pour en extraire le pigment cherché.

Ce résultat est obtenu par un moyen détourné qui consiste à soumettre le tissu hépatique à la digestion, comme moyen de destruction extrêmement pénétrant et complet. Nous avons eu recours à la digestion papainique qui, s'exécutant en milieu *neutre*, altère le moins possible la substance que l'on cherche à obtenir. D'ailleurs, nous avons employé aussi la digestion avec le suc gastrique artificiel, et comparé les résultats.

Digestion papainique du tissu hépatique. — Nous employons la papaine de Billaut-Billaudot en solution à 1 0/0. On met dans un matras de 150 centimètres cubes environ

50 centimètres cubes de solution papainique à 1 0/0 et 10 grammes de tissu hépatique frais.

Le matras est porté à l'étuve à 37°. On prépare plusieurs matras de ce genre.

Après que la digestion est terminée, on constate l'existence d'une liqueur colorée en jaune rouge et un dépôt.

L'intensité de la couleur rouge de la liqueur dépend de sa concentration. D'abord jaune, elle passe à l'orangé et au rouge par évaporation. Le dépôt est gris cendré ; par dessiccation, il devient brun rouge. Il résulte de là que dans la destruction de la cellule, il y a eu mise en liberté d'un *pigment soluble* dans le milieu de la digestion (peptones, sucre, etc.) et, d'autre part, un *pigment insoluble* est resté attaché au résidu solide de la digestion.

Ce résidu est recueilli, séché et traité par le chloroforme. Celui-ci prend une couleur jaune qui, par concentration, passe à l'orangé, puis au rouge.

Il y a maintenant deux questions préliminaires à se poser :

1° Les deux pigments que nous avons appelés *pigment aqueux* et *pigment chloroformique* sont-ils distincts ?

2° Ces deux pigments préexistent-ils réellement dans le tissu hépatique ou bien ne seraient-ils pas le produit de l'altération digestive produite par la papaïne ?

Les deux pigments sont distincts (en tous cas distincts sont les supports auxquels ils seraient fixés).

1° A la vérité, leurs spectres d'absorption sont très analogues ; mais aussi n'ont-ils rien de caractéristique. Comme les spectres des pigments biliaires (bilirubine, biliverdine), ils n'offrent point de bandes isolées, mais seulement deux plages sombres vers les deux extrémités rouge et violette, particulièrement vers le rouge.

2° Mais ils se distinguent (ou leurs supports) par leur solubilité :

Le pigment aqueux est insoluble dans le chloroforme et l'alcool ; le pigment soluble dans le chloroforme et l'alcool est insoluble dans l'eau.

Nous avons eu recours également à la digestion gastrique artificielle par comparaison avec la digestion papaïnique. Nous verrons tout à l'heure les conclusions auxquelles conduit cette comparaison.

Nous citerons d'abord une expérience complète :

Expérience. — *Chien* de 10 kilog.

L'animal est sacrifié par hémorrhagie. On pratique le lavage du foie.

Le foie ayant été bien débarrassé de son sang par le lavage, on en prélève des échantillons aussi identiques que possible de 10 grammes chacun, destinés à être soumis à des digestions gastrique et papaïnique plus ou moins prolongées.

- | | |
|---|--------|
| I. Foie frais haché | 10 gr. |
| Papaïne sol. 1 0/0 | 50 cc. |
| II. Foie frais haché | 10 gr. |
| Suc gastrique artificiel (porc) | 50 cc. |

Ce premier couple sera laissé 5 heures à l'étuve à 37°.

Deux autres ballons semblables III et IV sont additionnés de 2 gouttes de la solution alcoolique de thymol à 1 0/0 et resteront 24 heures à l'étuve.

Deux autres ballons V et VI, semblables aux précédents, sont destinés à rester pendant 48 heures à l'étuve.

Quand le terme de la digestion (5 h. ; 24 h. ; 48 h.) est arrivé, on retire les ballons et l'on sépare, par filtration, la liqueur de la partie insoluble ; dans le cas de digestion gastrique, on neutralise la liqueur ; celle-ci est lavée, puis séchée à 105° jusqu'à constance du poids.

Les 10 grammes de foie frais correspondent en poids sec à 2 gr. 120 (rapport 4.7). Ce chiffre a été déterminé sur un échantillon de 10 grammes, prélevé sur la même masse que les lots précédents et séché à l'étuve.

— Après 5 heures de digestion on retire les ballons I et II et on fi litre.

Le BALLON I a une couleur jaune orangé clair. Le résidu (4 gr. 435) de couleur brun cendré est mis à dessécher à 105°. Il produit un poids sec de 1 gr. 120. Sur les 2 gr. 120 (foie sec), il y a donc eu une quantité correspondant à 1 gr. 100 qui a été digérée et est passée en solution dans la liqueur papainique, sous forme de peptones et propeptones et une quantité correspondant à 1 gr. 020 qui a résisté à la digestion (*résidu sec de digestion*).

Le BALLON II (digestion gastrique) nous donne les résultats suivants : liqueur de couleur jaune opalescent ; résidu frais de la digestion gastrique : 4 gr. 730, desséché 1 gr. 65. Sur les 2 gr. 120 de l'échantillon (évalué à l'état sec) il y a eu 1 gr. 055 qui a été digéré et liquéfié : 1 gr. 065 qui a résisté.

— Après 24 heures on retire les ballons III et IV.

BALLON III (digestion papainique). Liquide de digestion de couleur jaune orangé foncé, formé de peptones et propeptones. Résidu de digestion : à l'état frais 2 gr. 150 ; à l'état sec 0 gr. 440. Sur les 2 gr. 120 de l'échantillon (évalué à l'état sec) il y a 1 gr. 680 digéré et liquéfié : 0 gr. 440 qui ont résisté. Ce résidu devient rouge brun par la dessiccation.

BALLON IV (digestion gastrique). Liquide de digestion de couleur jaune opalescent. Résidu de digestion gastrique ; à l'état frais 3 gr. 560 ; à l'état sec 0 gr. 675. Sur les 2 gr. 120 de l'échantillon il y a eu 1 gr. 445 digéré et liquéfié : 0 gr. 675 ont résisté.

— Après 48 heures, on retire les ballons V et VI.

BALLON V (digestion papainique). Liquide de digestion de couleur rouge. Résidu de digestion papainique ; à l'état frais, 0 gr. 920 ; à l'état sec 0 gr. 150. Sur les 2 gr. 120 de l'échantillon (évalué à l'état sec) il y a eu 1 gr. 970 digéré et liquéfié ; et 0 gr. 150 ont résisté à la digestion et forment une poudre rouge.

BALLON VI (digestion gastrique). Liquide de digestion de couleur jaune opalescent. Résidu de digestion gastrique : à l'état frais 1 gr. 250 ; à l'état sec 0 gr. 270. Sur les 2 gr. 120 de l'échantillon (évalué à l'état sec), il y a eu 1 gr. 850 digéré ; il y a eu un résidu rouge de 0 gr. 270.

En résumé, la digestion papaïnique est la plus complète ; prolongée 48 heures, elle fournit le maximum des produits qui peuvent être extraits du tissu hépatique. C'est à savoir : 1° *une liqueur neutre* de couleur rouge, saline, contenant des peptones et du sucre et tenant en dissolution ce que nous avons appelé le pigment hépatique aqueux et 2° une poudre rougeâtre, qui abandonnera à l'alcool ou au chloroforme, le second pigment, *le pigment chloroformique*, en laissant une petite quantité d'un dépôt insoluble, grisâtre.

Nous constatons d'abord que ces pigments se distinguent par leur solubilité.

On évapore la liqueur aqueuse au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse ; elle fonce de plus en plus. Lorsque l'évaporation est terminée, on traite par l'alcool ou mieux par le chloroforme. Il n'y a pas dissolution ; le chloroforme ni l'alcool ne se colorent.

Inversement, la solution chloroformique évaporée ne se dissout pas dans l'eau.

5. Les deux pigments ne sont pas le résultat d'une altération opératoire. — Avant de procéder à une étude plus complète, nous avons à nous demander si les pigments ainsi recueillis, préexistent bien dans le tissu hépatique ou s'ils ne seraient pas le résultat d'une altération produite par la digestion.

Avant de répondre à cette question, il faut remarquer qu'en ce qui concerne le pigment chloroformique, il est le même soit que l'on traite le résidu de la digestion papaïnique, soit que l'on opère sur le résidu de la digestion gastrique. Au contraire, la liqueur gastrique paraît avoir altéré le pigment aqueux : on n'observe qu'une teinte jaune opalescente que la concentration ne fait pas beaucoup changer. A cet égard, tout l'avantage est à la digestion papaïnique.

Ceci posé, revê nons à la question de savoir si nos deux pigments sont des produits naturels ou artificiels. Au lieu de soumettre le tissu hépatique à la digestion pour en extraire ses pigments, opérons directement sur le foie lui-même. Le tissu hépatique est haché, placé dans le vide, au-dessus de l'acide sulfurique.

On achève la dessiccation à 105°, à l'étuve. On broie énergiquement la poudre ainsi obtenue, dans un mortier. Puis, on met macérer à l'eau froide ou tiède, très légèrement alcalisée par la soude ou par le carbonate de soude. La liqueur prend une coloration jaune rouge, se fonçant de plus en plus par concentration. On peut s'assurer par diverses épreuves, dont il sera question plus loin, que le pigment ainsi obtenu est le même qui existait tout à l'heure dans le liquide de digestion papainique ; seulement il est moins abondant. Le dépôt qui se précipite, étant séché, est ensuite traité par le chloroforme ; il fournit le second pigment, ici encore moins abondant que dans le cas de la digestion. Les produits sont donc les mêmes.

Il résulte de là que le moyen que nous avons employé, c'est-à-dire la *digestion papainique*, n'apporte pas de perturbation sensible dans la situation des pigments : c'est *seulement un artifice qui en facilite l'extraction*.

6. Comparaison des digestions gastrique et papainique du tissu du foie. — Une autre particularité mérite d'être mise en lumière. On sait que le suc gastrique attaque et décompose les nucléo-albumines ; il les précipite d'abord, ces composés n'étant pas stables en milieu acide ; puis il peptonise le noyau albuminoïde et dépose la nucléine et les dérivés nucléiniques. La digestion en milieu neutre, ce qui est le cas de la digestion papainique, est beaucoup

moins altérante : une partie tout au moins de ces nucléo-albumines lui résiste et reste en solution. C'est ce qui explique que l'on obtienne ensuite un précipité peu abondant (précipité de nucléo-albumines), lorsque l'on acidifie légèrement la liqueur papainique. On comprend aussi que le résidu de la digestion soit plus abondant avec la liqueur gastrique qu'avec la liqueur papainique. La différence trouvée plus haut, après achèvement de la digestion entre les résidus secs papainique 0 gr. 150 et gastrique 0 gr. 270, c'est-à-dire 0 gr. 120, est principalement formée par ce dépôt de nucléines, et dérivés nucléiniques. C'est lui qui subsiste à l'état de poudre grise cendrée après qu'on a traité par l'alcool ou le chloroforme. Dans le liquide acide de la digestion gastrique, il n'y a pas de nucléo-albumine en solution. La teinte d'autre part est plus faible. Ceci tendrait à faire admettre qu'une partie de la teinte de la liqueur (c'est-à-dire une partie des pigments) est liée à ces nucléo-albumines ferrugineuses, analogues à celle qu'a fait connaître Bunge.

D'autre part, ce pigment est loin d'être seulement formé par des nucléo-albumines ferrugineuses, puisque la liqueur acide, gastrique, qui en est dépourvue présente encore une pigmentation jaune. Ces détails auront leur importance quand nous parlerons du fer contenu dans ce pigment aqueux.

7. Étude du pigment hépatique soluble. — La matière colorante qui est en solution dans la liqueur de digestion papainique (ou qu'on obtient encore du foie par l'action d'un alcali faible) n'a pas été isolée. Nous nous sommes contenté dans ce premier travail d'en étudier les principales propriétés.

La liqueur traitée par les acides, l'acide chlorhydrique, l'acide acétique glacial, ne présente pas de modification.

Quelquefois l'acide a produit un précipité ne se redissolvant point dans l'excès.

De même la soude ne produit pas d'altération apparente ; quelle qu'en soit la quantité, il n'y a ni précipité, ni changement de couleur. Pas de réaction de Gmelin. L'acide azotique nitreux produit un précipité blanc avec formation d'une couche jaune qui s'étend, à la fin, à toute la masse.

Les agents oxydants n'exercent pas d'action appréciable. L'eau chlorée, bromée, iodée, ne déterminent ni changement de couleur, ni précipité. Les agents réducteurs, hydrogène sulfuré, sulfhydrate d'ammoniaque, sont sans action en liqueur neutre ; en liqueur acide, le sulfhydrate d'ammoniaque produit un précipité noir et la liqueur verdit légèrement.

L'eau oxygénée présente une réaction remarquable en elle-même et parce qu'elle établit une analogie avec la sécrétion biliaire. L'eau oxygénée, à peu près neutre, est décomposée violemment par la liqueur hépatique de digestion papainique, comme par la bile. La liqueur papainique elle-même n'a pas d'action. La liqueur de digestion bouillie ne décompose plus ainsi l'eau oxygénée.

La chaleur détermine un léger précipité floconneux. Le vide ne produit aucun changement.

La lumière ne paraît pas exercer d'action bien nette.

Le spectre d'absorption ne présente pas de bandes isolées : il offre seulement deux plages sombres aux deux extrémités rouge et violette.

8. Pigment hépatique chloroformique. — Nous avons essayé les mêmes réactions avec le pigment chloroformique. On l'obtient, comme nous l'avons dit, en traitant par le chloroforme le résidu sec de la digestion papainique ou

la poudre de foie séché, épuisée par l'eau très légèrement alcalisée au moyen du carbonate et séchée de nouveau. Ces poudres deviennent rouges par la dessiccation : le chloroforme leur enlève le pigment et les laisse, après épuisement, à l'état de masse pulvérulente grise. On utilise pour l'étude des propriétés soit la solution chloroformique, soit la solution alcoolique.

L'acide acétique ne produit pas de changement. La solution alcoolique de soude détermine un précipité qui disparaît par agitation en présence d'un excès de réactif.

Avec le réactif de Gmelin (acide nitrique nitreux) on n'obtient pas d'effet.

Il importe toutefois de faire ici une observation : Si l'on emploie la solution alcoolique, que l'on traite par l'acide nitrique nitreux, on peut voir, en attendant suffisamment, à la limite de séparation des deux liquides, une teinte verte qui fonce de plus en plus et passe enfin au bleu clair.

Mais il est à noter que cette réaction appartient *aux réactifs eux-mêmes* (alcool et acide nitrique nitreux). On l'obtient en effet avec ces liquides purs. C'est ce fait qui probablement a induit en erreur quelques observateurs, par exemple M. Cadiat (1).

Les agents oxydants exercent une action qu'il faut signaler.

Employons, par exemple, la solution alcoolique d'iode et faisons-la agir sur la solution alcoolique du pigment. La couleur se fonce davantage : si l'on est parti de la couleur jaune (concentration faible) la solution passe au rouge.

(1) CADIAT, La structure du foie des invertébrés. *Gazette médicale*, p. 270, 1878.

Si l'on fait ensuite passer un courant d'hydrogène sulfuré, la couleur s'éclaircit et revient au jaune pâle initial ; après avoir chassé l'hydrogène sulfuré par la chaleur, la liqueur gardant sa couleur, on peut faire agir à nouveau l'alcool iodé et reproduire les mêmes alternatives.

La chaleur détermine un changement de teinte : la solution devient plus foncée.

La lumière n'exerce pas d'effet sensible.

Quant au spectre d'absorption, il n'a non plus que le précédent (non plus que celui du pigment biliaire) rien de caractéristique. Il n'y a point de bandes nettement limitées, mais seulement deux plages s'arrêtant aux divisions : 30 pour le rouge ; 80 pour le bleu-violet (spectre : raie D = 50 ; raie strontium = 105).

9. Distinction des deux pigments. — En résumé, il y a des différences entre le *pigment aqueux* et le *pigment chloroformique*, au point de vue de la solubilité et au point de vue de l'action des agents oxydants et réducteurs. Mais ce sont là des différences insignifiantes en comparaison de celle qu'il nous reste à signaler.

Il y a, en effet, entre ces pigments une différence capitale : c'est à savoir leur composition. L'un est ferrugineux, c'est le pigment aqueux, l'autre ne contient pas de fer, c'est le pigment chloroformique.

C'est l'analyse par la méthode indiquée plus haut, qui manifeste ce résultat. Mais, comme nous allons voir, les réactions le montrent aussi.

10. Pigment aqueux ou ferrugineux. — On peut essayer de se former une idée de la quantité de fer contenue dans ce pigment.

On prend une portion des 50 centimètres cubes du liquide de digestion papainique (de 10 gr. de foie) liquide qui contient le pigment

hépatique aqueux. On l'analyse au point de vue du fer ; le chiffre trouvé est 0 mgr. 22 pour 10 grammes de liquide. Pour la totalité du liquide papainique, nous avons donc une quantité de fer égale à 1 gr. 10 ; c'est la quantité même qu'une analyse directe d'un échantillon identique a fournie pour le fer des 10 grammes de foie soumis à la digestion.

En résumé, on arrive (d'une autre manière) à cette conclusion que nous avons déjà indiquée tout à l'heure, à savoir :

Le pigment aqueux, obtenu en solution par la digestion papainique du foie, contient à peu près tout le fer du foie. La quantité qui subsiste dans le résidu de cette digestion est insignifiante.

11. Fixation du pigment hépatique ferrugineux par le charbon animal. — Si l'on filtre la liqueur de digestion papainique sur le charbon animal, on constate qu'il passe décoloré. Le charbon a retenu la matière colorante. Il n'y a plus que des traces de fer dans le liquide incolore.

On voit que le lien est tout à fait étroit entre le métal et la matière colorante : si l'on fait disparaître la coloration, on fait disparaître le fer ; c'est une nouvelle démonstration que le pigment hépatique est la matière ferrugineuse elle-même.

12. État du fer dans le pigment hépatique soluble. — Nature du pigment hépatique aqueux. — Ferrine et nucléo-albumines ferrugineuses. — On sait la distinction qui a été établie par les chimistes entre les 2 formes sous lesquelles le fer peut exister dans l'organisme.

1° Il peut être en quelque sorte dissimulé dans une combinaison organique où il se trouve fortement lié. C'est ce que l'on appelle le *fer organique* dont les *nucléo-albumines ferrugineuses* de Bunge et son *hématogène*, en particulier, fournissent le type.

Ces combinaisons sont caractérisées en ce que, en solution légèrement alcaline, légèrement ammoniacale, elles ne précipitent point par le sulfure d'ammonium, ou seulement très lentement. L'addition du ferrocyanure avec acidification par l'acide chlorhydrique ne donne pas ou donne seulement très lentement le précipité du bleu de Prusse.

Traitées par l'acide chlorhydrique alcoolique (alcool à 95° 90 vol. ; HCl à 25 0/0 10 vol.), elles n'y sont pas solubles, ou si elles s'y dissolvent, elles ne donnent avec le ferrocyanure de potassium qu'une réaction très lente.

2° La seconde forme est la *forme saline, minérale*. Les réactions précédentes qui échouaient tout à l'heure, réussissent immédiatement.

Entre ces deux formes pourrait se placer comme une troisième forme l'albuminate de fer, la ferro-albumine, la ferratine de Marfori, qui, en effet, est moins résistante que la première catégorie, mais plus que la seconde. L'usage semble prévaloir cependant de rattacher ce dernier composé à la *forme minérale* ou *saline*.

Si l'on essaye à ce point de vue la liqueur chargée de pigment aqueux, on constate facilement que la plus grande partie du fer n'y est pas dissimulée d'une façon appréciable. Le métal est très faiblement lié à la matière organique (probablement aux peptones). Nous pourrions dire qu'il y est sous la forme saline. La réaction avec le sulfhydrate d'ammoniaque fournit une liqueur verte où se dépose bientôt un précipité.

Le traitement par le ferrocyanure de potassium acidifié par l'acide chlorhydrique donne un précipité de bleu de Prusse immédiat.

Ferrine. — Il devient maintenant possible de résoudre la dernière question de la couleur du foie.

Cette couleur n'est pas homogène ; elle est due à plusieurs pigments qu'il faut d'abord diviser en deux catégories : la catégorie des pigments aqueux et ferrugineux, la catégorie des pigments chloroformiques ou alcooliques. Nous avons parlé jusqu'ici de chacune de ces catégories comme si elle était formée d'un pigment unique. Ce n'est pas tout à fait exact, au moins pour les pigments aqueux, ferrugineux. Là comparaison, faite plus haut (n° 6) de la digestion acide du foie avec la digestion neutre et d'autre part les réactions indiquées au n° 10 nous montrent qu'une petite partie est constituée par des nucléo-albumines ferrugineuses, mais que la majeure partie de ces pigments solubles est formée d'un *composé analogue à la ferratine de Marfori et Schmiedeberg*. Ce composé, étudié dans le produit de la digestion papaïnique se distingue de la ferratine par quelques traits accessoires. Admettons pour la ferratine les propriétés suivantes :

Poudre jaune; soluble dans les solutions étendues d'alcalis et carbonates alcalins ; précipitée de ses solutions alcalines par les acides étendus, mais soluble dans un excès d'acide ; lenteur de la réaction avec le sulfure d'ammonium ; lenteur de la réaction colorée avec le ferrocyanure ; solubilité dans l'acide chlorhydrique alcoolique (réactif de Bunge).

La majeure partie de notre pigment (fourni par la liqueur neutre papaïnique) est :

Soluble en milieu neutre ; non précipitée par les acides ; soluble même dans une faible quantité d'acide, et non pas seulement dans un grand excès. Enfin les réactions avec le sulphydrate d'ammoniaque et le ferrocyanure acidifié n'ont pas besoin d'un aussi long délai pour s'accomplir.

Il résulte de là que notre pigment est seulement très voisin de la *ferratine* ; il se rapproche plus qu'elle de la

forme saline du fer. Il a été obtenu par la digestion papainique en milieu neutre : la ferratine de Marfori et Schmiedeborg par la dissolution dans les alcalis très étendus. L'un et l'autre procédés sont très peu capables d'altérer l'état naturel de la matière. Le nôtre est-il plus altérant que celui des auteurs allemands ; ou est-ce l'inverse ? C'est difficile à décider. Pour ne pas préjuger la question, désignons par le nom de *ferrine* l'état naturel, dans le foie vivant, de ce pigment aqueux, ferrugineux. A cette ferrine il faut ajouter, comme nous l'avons dit plus haut, une très petite quantité de *nucléo-albumines ferrugineuses*. C'est ce mélange de *ferrine* et d'une faible quantité de nucléo-albumine ferrugineuse qui constitue le pigment aqueux du foie.

13. Nature du pigment chloroformique. — Quant au pigment chloroformique, on peut le rapprocher des pigments biliaires d'une part et d'autre part des lipochromes et lutéines, catégories entre lesquelles il est intermédiaire. Nous l'appellerons, en conséquence, *choléchrome*.

1° *Couleur*, partie chaude du spectre, gamme jaune rouge, comme les lipochromes ;

2° *Solubilité* de même dans le chloroforme, la benzine ; insolubilité dans l'éther conformément à ce qui arrive pour les pigments biliaires, mais contrairement à la plupart des lipochromes.

3° *Les procédés d'oxydation ou de déshydratation* qui font passer les lipochromes comme les pigments biliaires à la gamme verte et bleue, sont sans effet sur le pigment hépatique du foie ou du moins agissent sur lui en le poussant au rouge, vers la partie la moins réfringente du spectre. Il est à noter que le passage au vert que l'on observe en traitant la solution alcoolique par l'acide nitrique

nitreux s'obtient avec l'alcool ou le chloroforme purs et se produit d'ailleurs lentement (V. 8, p. 112).

4° Les procédés de réduction (courant d'hydrogène sulfuré) ramènent le pigment oxydé à l'état initial comme cela a lieu avec les pigments biliaires.

5° Le spectre d'absorption est le même que pour les lipochromes et les pigments biliaires, c'est-à-dire qu'il n'offre pas de bandes limitées, mais seulement deux plages extrêmes l'une dans le rouge, l'autre dans le violet spectral.

Les résultats typiques que nous venons d'obtenir chez le chien peuvent être appliqués aux autres classes de vertébrés. Un grand nombre de vérifications de détail faites chez ces animaux nous ont montré des faits concordants avec les précédents, qui prennent ainsi un véritable caractère de généralité.

14. Reptiles. — Nous avons opéré sur les lézards, exactement comme sur le chien.

Quoique l'opération soit plus difficile, on réussit à laver le foie avec l'eau salée ; on le hache et le sèche dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique. La poudre de foie (obtenue de plusieurs animaux) est divisée en deux lots :

L'un des lots est soumis à la digestion papaïnique ; le résidu est traité par le chloroforme ou l'alcool.

Le second lot est traité par l'eau très légèrement alcalisée ; le résidu pris par le chloroforme.

On obtient ainsi les deux pigments : l'un aqueux et ferrugineux ; l'autre chloroformique. Le spectre et les autres caractères sont les mêmes que chez le chien.

15. Batraciens. — Même chose chez la grenouille. Le lavage du foie y est beaucoup plus facile que chez le lézard. L'organe prend une teinte claire. On répète cette opération

sur un assez grand nombre d'animaux pour avoir une quantité de tissu hépatique suffisante pour les recherches.

Mêmes résultats avec les tritons, salamandres. On trouve les deux pigments, l'un soluble dans la liqueur de digestion papainique et dans les solutions faiblement alcalines et ferrugineuses, l'autre soluble dans le chloroforme et l'alcool.

16. Poissons. — Nous avons fait des recherches de même genre chez différents poissons, carpes, etc. Le résultat a été identique.

En résumé, chez tous les vertébrés, on trouve dans le foie deux pigments de couleur jaune rouge : l'un peut être totalement extrait par la digestion papainique, est soluble dans la liqueur neutre de digestion, ou en général dans l'eau très faiblement alcalisée, insoluble dans l'alcool et le chloroforme, riche en fer (ferrine, nucléo-albumine ferrugineuse).

L'autre est un pigment soluble dans le chloroforme, moins soluble dans l'alcool, moins dans l'éther, insoluble dans l'eau ; non attaqué par la digestion papainique, ne contenant point de fer (*choléchrome*).

§ 2. — Pigments hépatiques chez les invertébrés.

17. La recherche des pigments hépatiques se trouve simplifiée chez les invertébrés. Chez le plus grand nombre de ces animaux, le sang est peu ou point coloré, de telle sorte qu'il n'y a pas à craindre que la couleur du foie soit dissimulée par celle du sang. Dès lors, il n'est pas nécessaire de pratiquer le lavage du foie, opération qui d'ailleurs serait vraisemblablement très difficile.

C'est seulement chez les invertébrés dont le sang est fortement pigmenté qu'il y aura à cet égard des précautions à prendre.

Nous avons recherché les pigments hépatiques dans les groupes des mollusques et des crustacés où l'organe hépatique est congloméré et plus facile à étudier.

18. Mollusques. — Entre autres mollusques nous avons examiné : parmi les gastéropodes, les hélix, les buccins ; parmi les lamellibranches : les moules, les pectens et les huîtres ; parmi les céphalopodes : les poulpes et les seiches.

19. Escargots (Hélix). — *a)* Les escargots sont des animaux de choix, pour les expériences, et cela pour deux raisons : la première c'est que l'on peut se les procurer en abondance et en tout temps ; la seconde c'est que, en même temps que le foie, on peut recueillir aussi la sécrétion hépatique, circonstance qui permettra de comparer les pigments de l'organe aux pigments de la sécrétion.

Expérience. — En ouvrant la coquille, on aperçoit le manteau que l'on observe dans la partie qui recouvre le sac pulmonaire. Celle-ci peut être claire ou foncée, il y a en effet un pigment noir, plus ou moins abondant qui se dépose le long des vaisseaux et sur le bord libre du sac pulmonaire. Vers la partie postérieure, on aperçoit par transparence le foie. Celui-ci est plus ou moins fortement coloré, tantôt en brun foncé, tantôt en jaune clair.

Une remarque intéressante, c'est que le foie est sombre chez les animaux où les vaisseaux du sac pulmonaire sont chargés de pigment : le foie est clair, lorsque ces vaisseaux sont peu colorés ; de telle sorte que la seule inspection du sac pulmonaire fournit un premier renseignement sur la couleur du foie.

On dissèque et on isole l'organe avec précaution ; on l'enlève. Les

foies enlevés à un grand nombre d'escargots sont réunis, transformés en bouillie, puis portés dans l'exsiccateur au-dessus de l'acide sulfurique. On obtient en 24 heures une dessiccation à peu près complète, qui permet de broyer les foies.

On a ainsi la *poudre de foie* (400 escargots nous ont donné 42 grammes de poudre sèche ; un corps d'escargot pèse en moyenne 3 gr. 500 et le foie 0 gr. 7.

De cette poudre, on fait 2 lots qui vont servir à l'extraction des pigments :

1° Le premier lot est traité par le chloroforme ou l'alcool ; la liqueur filtrée est de couleur jaune : c'est le *pigment chloroformique* ou *alcoolique*.

2° Le deuxième lot est soumis à la digestion papainique, à l'étuve à 37°. On a un dépôt brun et un liquide de digestion. Ce liquide filtré est de couleur rouge foncée, c'est le *pigment aqueux*.

On constate que les *deux pigments, aqueux et chloroformique*, présentent les plus grandes analogies avec ceux que nous avons trouvés chez les vertébrés.

Le *pigment chloroformique* ne contient pas de fer, il est insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool, à peu près insoluble dans l'éther.

Le *pigment aqueux* est ferrugineux (ferrine). Il contient à peu près tout le fer que l'on rencontre dans le foie. On peut l'obtenir sans recourir à la digestion papainique, en traitant simplement par l'eau très légèrement alcalisée, la poudre de foie desséchée. La seule différence c'est que ce procédé d'extraction ne pourrait pas suffire à épuiser le tissu hépatique. On voit par là, en tout cas, que ce pigment n'est pas un produit artificiel dû au procédé de la digestion papainique, mais réellement la substance existant naturellement dans le foie.

Le noir animal peut enlever à ce liquide tout son pig-

ment ; la liqueur filtrée passe incolore et ne renferme plus que des traces de fer.

Nous trouvons donc ici l'*exacte répétition de ce que nous avons vu chez le chien et les vertébrés : les deux mêmes pigments avec les mêmes propriétés.*

b) Mais il y a une *différence* importante. Elle est relative aux *spectres*. Tandis que chez les vertébrés les deux pigments du tissu hépatique (semblables à cela aux pigments de la bile) donnaient le même spectre sans bandes proprement dites, éteint seulement aux deux extrémités) ; ici, chez l'escargot, les spectres sont différents.

— Le *pigment aqueux* présente un *spectre à deux bandes* étroites, dans le vert, entre D et F, correspondant au repérage suivant : (D — 50 — raie du sodium ; 105 — raie du strontium) la première bande entre 59-62 et la deuxième bande entre 68-72. Hémochromogène.

Nous verrons, chose remarquable, que ces mêmes bandes existent dans la sécrétion hépatique de l'escargot.

— Quant au *pigment chloroformique*, il présente un spectre très remarquable et que nous retrouvons souvent ; c'est un *spectre à quatre bandes* : une bande très noire dans le rouge entre 29-34 ; une bande faible dans l'orangé entre 42-46 et deux autres bandes dans le vert ; l'une entre 62-66 sombre, mais moins que la première : une autre enfin entre 75-82 qui est la troisième par ordre d'importance.

Krukenberg (1) et Mac Munn ont fait des extraits alcooliques de foie de mollusque, et particulièrement d'escargot. L'examen spectroscopique leur a montré des bandes

(1) KRUKENBERG, Ueber das Verhältniss der Leberpigmente zu den Blutfarbstoffen bei den Wirbellosen. — *Vergleichend-Physiologische Studien*, Heidelberg, 1881, III, p. 181.

d'absorption qu'ils considèrent comme inconstantes, sauf une seule, qui se confond sensiblement avec la première de nos bandes dans le rouge (29-34). — Nous sommes obligés de dire que nous avons toujours trouvé les trois autres bandes. Le spectre à quatre bandes nous paraît d'une caractéristique du pigment *chloroformique* du foie.

c) SÉCRÉTION HÉPATIQUE DE L'ESCARGOT. — Nous avons dit qu'il était difficile, en général, d'obtenir en quantité suffisante la sécrétion hépatique chez les animaux de petite taille, chez les mollusques, chez les crustacés. Tout d'abord, cette sécrétion est très peu abondante ; en second lieu, elle est souillée par les matières alimentaires.

L'escargot toutefois présente une particularité qui supprime cette difficulté d'observation, ou, tout au moins, l'atténue. Il s'enferme dans sa coquille pour hiberner. Il sécrète un diaphragme qui clôt la coquille. Au-dessous de ce diaphragme on trouve, en général, un anneau noirâtre représentant les derniers excréments évacués. L'intestin désormais vide va se remplir de la sécrétion du foie, (sécrétion ralentie sans doute, comme les autres phénomènes vitaux), qui continue à s'y accumuler au point de le distendre.

En ouvrant l'intestin de l'escargot en hibernation on recueillera donc cette sécrétion hépatique. C'est une masse consistante d'une belle couleur rouge-rubis ; cette liqueur a été vue par beaucoup d'observateurs. Krukenberg l'a nommée *helicorubine* (1). On peut en recueillir quelquefois près d'un demi-centimètre cube chez un seul animal. Si l'on suit la matière en remontant jusqu'au cæcum intestinal où débouchent les canaux hépatiques, on constate que ce

(1) KRUKENBERG, Ueber das Helicorubin und die Leberpigmente von *Helix pomatia*. *Vergleichend-Physiologische Studien*, II^e série, 1882, p. 63.

dépôt se continue dans ces canaux hépatiques et qu'il constitue bien, par conséquent, la sécrétion du foie. Lorsque dans la dissection, l'on déchire le tortillon, on détruit en même temps des canaux hépatiques et l'on donne issue au liquide.

Propriétés de la sécrétion hépatique. — 1° La liqueur biliaire rouge-rubis ainsi obtenue présente une réaction légèrement acide due au suc intestinal qui s'y mêle et qui a cette réaction constante.

2 Elle est soluble dans l'eau ; insoluble dans le chloroforme, l'alcool, la benzine, etc.

3° Elle offre des *caractères spectroscopiques* remarquables et qui ont été déjà signalés par Sorby (1876) et Mac Munn (1883) (1). C'est un *spectre à deux bandes* presque identique à celui de l'hémochromogène. Il a en commun avec l'hémochromogène ce caractère remarquable qui a été ignoré de Sorby, Lankester et Krukenberg d'être *riche en fer*.

4° *Fer.* — Nous avons analysé cette sécrétion hépatique au point de vue du fer.

Expérience. — 40 escargots nous ont fourni une masse d'environ 10 grammes de sécrétion hépatique. Ces 10 grammes donnent à l'état sec, 0 gr. 400 de résidu, rouge sombre, soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme. L'analyse colorimétrique nous fournit 0 mmg. 18 de fer ; soit pour 1 gramme de résidu sec 0 mmg. 45. [La bile du chien (bile vésiculaire) contient pour 1 gramme résidu sec entre 0 mmg. 06 et 0 mmg. 5. Le foie contient pour 1 gramme à l'état sec 0 mmg. 15.]

On voit qu'à l'état sec la sécrétion hépatique de l'escargot est plus

(1) SORBY, On the evolution of Hemoglobin. *Quart. Journ. Min., Sci.* XVI, p. 77 ; C. A. MAC MUNN, Observations on the Colouring matters of the so-called. Bile of Invertebrates, etc. *Proceedings of the Royal Sociétés*, XXXV, p. 377.

riche en fer que le tissu du foie (pris également à l'état sec). Mais ce rapport de grandeur ne nous apprend rien sur les tissus frais. Il peut-être renversé, si l'on considère que la sécrétion est plus riche en eau que le tissu du foie ; elle contient en effet de deux à dix fois plus d'eau que le tissu hépatique. Nous ne pouvons rien affirmer au point de vue quantitatif pour la sécrétion normale.

Le seul point important à retenir est que la sécrétion hépatique contient une quantité notable de fer 0 mmg. 47 pour 1 gramme de la sécrétion à l'état sec. Pour comparaison, nous rappellerons que 1 gramme d'hémoglobine à l'état sec contient 4 milligrammes de fer. On pourrait dire d'après cela que la bile de l'escargot est seulement neuf à dix fois moins riche en fer que l'hémoglobine des vertébrés. La question subsiste pourtant de savoir si, dans l'escargot, le fer est fixé au pigment coloré ou s'il en est indépendant. Nous penchons vers l'idée qu'il est fixe, par raison d'analogie.

5° L'analogie du spectre du pigment biliaire de l'escargot et du pigment hémochromogène, semble être corroborée ici par cette autre analogie résultant de ce que l'un et l'autre contiennent du fer.

Mais ces ressemblances peuvent n'être qu'apparentes. En réalité il y a *quelque différence* entre les deux pigments : peut-être ne sont-ils pas absolument identiques.

Nous en donnons deux arguments, pour ce qu'ils valent :

1° L'examen détaillé du spectre nous montre que les deux bandes de l'hémochromogène ne coïncident pas exactement avec celles du pigment biliaire de l'escargot.

Avec le spectre dont nous faisons usage (repérages : D. 50... strontium, 105) les bandes de l'hémochromogène correspondent à 58-63 et 68-76 ; celles du pigment de l'es-

cargot à 55-60 ; 68-72. Ce sont là les positions les plus voisines.

2° La quantité de fer du pigment biliaire (en la supposant fixée à ce pigment même, serait beaucoup moindre que celle de l'hémochromogène.

D'autre part, il y a identité de l'effet produit par le sulfhydrate d'ammoniaque et les réducteurs en général. Avec l'hémochromogène qui est de l'hématine réduite, les 2 bandes sont rendues plus évidentes ou ne changent pas ; il en est de même avec le pigment biliaire ; — les acides énergiques les font disparaître.

Nous n'avons jamais trouvé dans cette sécrétion un autre pigment l'*entérochlorophylle*, que Mac Munn croit y exister en faible quantité comme il existerait en forte quantité dans le foie des mollusques branchiaux. Nos spectres n'ont même jamais présenté la bande noire, dans le rouge, en B. — Nous dirons donc (sous les réserves faites précédemment à propos de l'hémochromogène), que c'est le seul pigment biliaire de l'escargot et que le nom doit être substitué à celui d'hélicorubine employé par Krukenberg.

d) IDENTITÉ DU PIGMENT DE LA SÉCRÉTION HÉPATIQUE AVEC LE PIGMENT AQUEUX HÉPATIQUE. — Si l'on compare le pigment aqueux du foie avec le pigment de la sécrétion hépatique, on est amené à conclure à l'identité de ces deux pigments par deux raisons, tirées l'une de la composition, l'autre de l'analyse spectrale.

1° L'un et l'autre sont riches en fer ; ils contiennent la même quantité de fer.

Expérience. — On prend la poudre sèche de foie d'escargot. On épuise cette poudre par de l'eau distillée alcalisée très légèrement par quelques gouttes de la solution de carbonate de soude à 2 0/0. Le pigment aqueux entre en solution. On évapore cette solution et on analyse par rapport au fer. 10 grammes de liquide ont fourni

0 gr. 250 de résidu sec, contenant comme fer 0 milligr. 12; soit pour 1 gramme sec — 0 milligr. 48.

Tout à l'heure, la sécrétion hépatique nous avait donné pour 1 gramme sec = 0 milligr. 45. Ce chiffre coïncide suffisamment avec le précédent, 0 milligr. 48 de fer pour 1 gramme sec de pigment aqueux.

2° Les spectres sont *sensiblement identiques*.

Le pigment aqueux ferrugineux donne le spectre à deux bandes : 59-62; 68-72, suffisamment superposé à celui du pigment hépatique, 55-60, 68-72; et ces spectres se comportent de même. Ils sont inaltérables par le sulfhydrate d'ammoniaque, etc.; ils sont détruits par les acides forts.

On notera les conséquences remarquables des observations précédentes :

1° La macération légèrement alcaline du liquide est très analogue à la sécrétion de l'organe. Ce n'est pas le cas, chez les vertébrés; la macération du foie y est très distincte de la bile.

2° Le pigment aqueux hépatique est, comme celui même de la bile (1), ou mieux de la sécrétion du foie, constitué par l'*hémochromogène*, ou, nous le disons une fois pour toutes, un produit très analogue. — On sera frappé de trouver soit dans le foie même, soit dans sa sécrétion, un pigment qui est le noyau fondamental de l'hémoglobine, étant donné que le sang de l'animal ne contient point d'hémoglobine (Hémoglobine = Hémochromogène + globine (protéide)).

(1) Nous employons quelquefois le mot de bile pour désigner la sécrétion hépatique. Il ne s'agit pas ici de bile véritable. Les invertébrés n'en ont point, si l'on appelle ainsi une sécrétion caractérisée par les acides biliaires. Leur sécrétion hépatique peut contenir des pigments; elle ne contient pas d'acides biliaires: elle n'est pas amère.

3° L'hémochromogène est le seul pigment aqueux du foie, comme il est le seul pigment de la sécrétion. Pas plus ici que tout à l'heure à propos de la sécrétion, nous n'avons trouvé de substance soluble dans l'alcool et dont le spectre alcoolique présenterait une raie dans le rouge, caractérisant ce que Mac Munn croit être une chlorophylle.

e) IDENTITÉ DES PIGMENTS HÉPATIQUES, AQUEUX ET CHLOROFORMIQUE, AVEC LES PIGMENTS DE LA COQUILLE. — On prend l'escargot gris (*Helix aspersa*), on cherche à se procurer les matières colorantes de la coquille.

Expérience. — On isole les coquilles ; on pulvérise. On traite par le chloroforme ou l'alcool. L'on obtient ainsi une liqueur colorée en rouge-jaune qui présente sensiblement les mêmes caractères que le pigment chloroformique du foie ; en particulier, le même spectre à 4 bandes que ce pigment alcoolique.

La poudre épuisée par l'alcool et le chloroforme est traitée par un acide étendu pour décalcification. Après neutralisation, une partie est soumise à la digestion papaïnique. Elle donne une liqueur colorée et jaune-brun. Cette liqueur contient précisément le pigment aqueux. On s'assure de cette identité par l'identité des spectres et de la teneur en fer.

Dans une seconde partie *b*, on détermine la quantité de fer directement par la méthode colorimétrique. On a soin de séparer par filtration le dépôt calcique, avant de porter dans le colorimètre.

Les matières colorantes de la coquille sont donc celles mêmes que nous avons trouvées dans le tissu hépatique. Déjà, dans le chapitre précédent, nous avons mis en lumière ce double rapport entre l'organe hépatique et l'appareil tégumentaire, en montrant que le foie contient des sels alcalino-terreux et du fer, comme la coquille : nous voyons ici que la coquille contient (entre autres) les mêmes pigments que le foie (1).

(1) Les rapports entre le foie et la coquille, sont surtout remarqua-

20. Lamellibranches. — *Huitre portugaise.* — Chez l'huitre, le foie ne peut être isolé qu'avec beaucoup de précautions : ses lobes ne sont pas distincts ni séparés aussi facilement de l'intestin que chez l'escargot. L'organe se présente avec une teinte jaune verdâtre qu'il conserve après dessiccation et réduction en poudre.

Pigment chloroformique. — La poudre sèche est traitée par l'alcool et le chloroforme. On obtient ainsi une liqueur jaune verdâtre. Le spectre de cette liqueur est le spectre à 4 bandes que nous avons déjà signalé, à savoir : 27-32 très noire ; 42-46 claire ; 62-66 noire ; 75-82 moins noire.

Pigment aqueux. — La digestion papainique appliquée au résidu de ce traitement, ou au foie directement, fournit une liqueur jaune. Cette liqueur est ferrugineuse. Le pigment qui la colore diffère du pigment aqueux de l'escargot (spectre à 2 bandes) et se rapproche du pigment aqueux hépatique des vertébrés, par ce caractère qu'il ne présente pas de bandes délimitées, mais seulement deux plages sombres aux extrémités du spectre, comme c'est le cas pour le pigment biliaire des vertébrés. Il est surtout composé de *ferrine*.

Moules. — Les résultats sont les mêmes. Nous en évitons la répétition.

Pectens. — Le foie se présente avec une couleur vert-brunâtre. On l'isole assez facilement, on le sèche dans le vide. Il fournit une poudre très hygrométrique que l'on conserve à l'exsiccateur.

Pigment chloroformique. — La poudre traitée par l'alcool-chloroforme, fournit une liqueur vert-foncé. Ce pig-

bles, au point de vue des sels minéraux, du fer et des pigments au moment de l'accroissement de la coquille.

ment est très facilement soluble. Au spectroscope il fournit le spectre caractéristique à 4 bandes, à savoir : 27-30 très noire ; 42-46 très claire ; 62-66 noire ; 75-82 moins noire.

Mêmes propriétés que dans les autres cas : même action des oxydants qui foncent la couleur et des réducteurs qui la ramènent à l'état initial, etc.

Pigment aqueux. — Par la digestion papaïnique, on obtient le pigment aqueux, ferrugineux, sans bandes (*Ferrine*).

21. Céphalopodes. — Seiche. — Poulpes. — Le foie se présente avec une couleur jaune chez la seiche, brune chez le poulpe. On l'extrait facilement, en évitant tout contact avec les pigments de la poche à encre. On dessèche. La poudre est traitée par l'alcool-chloroforme. Celui-ci prend une couleur rouge-orangé. Ce *pigment chloroformique* chez le poulpe donne le spectre ordinaire à 4 bandes (voir plus haut, *huître*).

Chez la seiche, au contraire, le *pigment chloroformique* est plus jaune et il ne donne pas le spectre à 4 bandes. Il fournit le même spectre sans bandes délimitées qui appartient aux pigments biliaires des vertébrés (bilirubine), à leur pigment hépatique alcoolique (choléchrome) et au pigment aqueux hépatique (*Ferrine*) des vertébrés et invertébrés, excepté l'escargot qui présente un pigment hépatique aqueux à 2 bandes (hémochromogène).

Le *pigment aqueux* est fourni par la digestion papaïnique. Il ne présente pas de bandes d'absorption au spectroscope. Il est riche en fer.

En résumé chez les mollusques que nous avons examinés, nous retrouvons les *deux pigments hépatiques* que

nous avons obtenus chez les vertébrés, avec quelques différences légères.

Le *pigment aqueux hépatique* est toujours ferrugineux (Ferrine). Il ne présente pas de bandes d'absorption (sauf le cas de l'escargot). Dans le cas de cet animal, on constate qu'il se confond avec le pigment de la sécrétion hépatique (hémochromogène).

Le *pigment chloroformo-alcoolique* est caractérisé par les mêmes traits de solubilité que nous avons déjà indiqués chez les vertébrés, et la même manière de se comporter avec les agents oxydants et réducteurs. Mais (sauf le cas de la seiche) il présente un spectre à 4 bandes, tandis que, chez les vertébrés, le spectre est continu.

Chez la seiche, le spectre est continu. Le pigment a tous les caractères de celui des vertébrés (choléchrome).

22. Observations critiques. — Comparaison relativement au pigment chloroformique. — On remarquera que nous n'avons rien conclu relativement à la nature du pigment alcoolo-chloroformique et que nous n'avons fait aucun rapprochement avec les pigments connus. D'autres auteurs l'ont fait et nous devons comparer nos résultats aux leurs.

Sorby et Mac Munn ont préparé leurs extraits alcooliques de foies de mollusques (et d'autres invertébrés) et les ont examinés spectroscopiquement.

Dans ces foies (*ostrea*, *mytilus*, *buccinum*, *anodonte*, *octopus*) Mac Munn distingue un pigment spécial qu'il appelle l'*entéro-chlorophylle* et qui serait en effet une variété de chlorophylle. Cette entéro-chlorophylle est caractérisée par un spectre à deux ou trois bandes dont la première seule serait tout à fait caractéristique.

Cette première bande siège dans le rouge sur la raie B excepté chez

l'*Octopus* et le *Buccinum nudatum* où elle serait reportée légèrement vers la raie C (*entéro-chlorophylle acide*). On trouverait une autre bande avant D, moins constante, une 3^e entre D et E, une 4^e vers F. Ces bandes sont réduites à deux (huitre) ; à trois (cardium, anodonte) ; il y en a 4 (buccin). Mais toujours la 1^{re} est caractéristique.

En traitant ces extraits alcooliques par quelques gouttes d'acide nitrique, Mac Munn a toujours obtenu le même spectre à 5 bandes, que l'on obtient en traitant de la même façon la *chlorophylle véritable*. L'acide azotique les fait passer au jaune et ils donnent les 5 bandes correspondant aux longueurs d'onde suivantes : 1^{re} bande dans le rouge, à cheval sur C, 664-643 ; 2^e bande en avant de D dans le jaune, 608-592 ; 3^e bande après D dans le jaune, 576-561 ; 4^e bande avant E, dans le vert, 539-518 ; 5^e bande avant F à la limite du vert et du bleu, 502-484. Ce sont précisément les mêmes nombres que pour les bandes de la chlorophylle végétale (*Primula*) traitée de même.

Une telle coïncidence absolument remarquable conduit Mac Munn à considérer le *pigment alcoolique du foie, chez ces animaux*, comme une chlorophylle : c'est son *entérochlorophylle*.

Somme toute, Mac Munn conclut que ce pigment alcoolique est formé de deux substances : l'*hémochromogène* et l'*entéro-chlorophylle*.

23. Absence d'hémochromogène. — Nous ne pouvons pas accepter ces conclusions.

En premier lieu, nous n'admettrons pas l'existence de l'hémochromogène dans ce pigment.

Si le foie a été d'abord desséché, ou même, si le résidu de la digestion papainique a été complètement desséché avant d'être soumis à l'action de l'alcool ou du chloroforme, on ne trouve plus d'hémochromogène. Tout celui-ci a passé dans la solution aqueuse. Les traces que l'on peut en observer quelquefois tiennent évidemment à une opération incomplète. Tout l'hémochromogène appartient au pigment aqueux.

Nous préférons le chloroforme à l'alcool. Il épuise plus complètement le tissu : il se colore plus fortement que l'alcool. Les solutions chloroformiques ne contiennent pas d'hémochromogène ; si on leur ajoute de l'acide, leur spectre ne change pas ; alors que les deux bandes que l'on pourrait être tenté d'attribuer à l'hémochromogène devraient disparaître.

Un second argument contre l'existence de l'*hémochromogène* est celui-ci :

L'hémochromogène est une substance très riche en fer : le pigment chloroformique est très pauvre. Si l'on adopte la formule $C^{32}H^{30}Az^4FeO^2$, on trouvera que cette substance contient près du dixième de son poids de fer, 1 gramme contient près d'un décigramme. Or l'analyse directe nous a montré qu'un gramme du résidu chloroformique évaporé ne contenait que des traces, c'est-à-dire moins de 2 centièmes de milligramme de fer.

24. Existence ou non-existence de l'entéro-chlorophylle.

— Dans le spectre à 4 bandes que nous avons observé à peu près constamment avec les solutions chloroformiques, il n'y a pas lieu de considérer les deux bandes du vert comme appartenant à l'hémochromogène. Les quatre bandes appartiennent à un autre pigment.

A la vérité, ces quatre bandes coïncident précisément avec celles du spectre de la chlorophylle.

Nous nous en sommes assurés en traitant des feuilles de fusain (Evonymus) par le chloroforme. Nous avons retrouvé le même spectre que nous a donné presque toujours l'examen des extraits chloroformiques de foies de mollusques, à savoir : 1^{re} bande caractéristique, sur la raie B (division 28), très noire, la largeur variant de 25 à 31 ; la 2^e, faible entre C et D, 42-46 ; la 3^e entre 62-66 dans le vert, entre D et E, vient après le 1^{er} comme netteté ; la 4^e dans le vert, après E, 75-82. L'addition d'acide azotique n'y change rien.

Nous ne doutons donc pas de l'identité de ce spectre avec celui de la chlorophylle. Mais nous doutons que cette

chlorophylle, cette entéro-chlorophylle soit un pigment propre du foie.

Les matières qui existent dans l'intestin peuvent parfaitement refluer dans les canaux hépatiques ; ou, pour parler plus exactement, l'intestin se ramifie dans le foie. Il est possible qu'il passe ainsi, dans le foie, de la chlorophylle digérée, ou non, que l'alcool enlèverait ensuite. On aurait affaire, dans ce cas, à un produit étranger.

Voici les deux raisons qui justifient notre doute.

1° Si l'on opère sur l'escargot, conservé longtemps à jeun (animal en hibernation), dont l'intestin a pu complètement se débarrasser de la chlorophylle alimentaire, on n'observe pas le spectre chlorophyllien. C'est là un exemple remarquable.

2° L'anodonte présente normalement, d'après Mac Munn, le spectre chlorophyllien. Or, sur des anodontes conservés 3 mois dans une eau courante, absolument débarrassée de végétaux verts, nous n'avons pas trouvé dans l'extrait chloroformique du foie le spectre chlorophyllien, ni même aucune de ses bandes. Le pigment chloroformique présentait un spectre continu, sans bandes, comme celui des lipochromes et des pigments biliaires et vertébrés, comme le pigment chloroformique des mêmes vertébrés (choléchrome).

25. Résultats généraux relatifs aux pigments du foie chez les vertébrés et invertébrés. — Si nous voulons embrasser d'un coup d'œil les résultats par nous obtenus dans la recherche des *pigments du foie* chez les vertébrés et les invertébrés, voici comment on pourra les résumer :

1° Le foie doit sa couleur à deux catégories de matières colorantes que nous distinguons de prime abord, par leur solubilité, à savoir : *les pigments aqueux et les pigments chloroformiques*.

2° A. **Les pigments aqueux**, sont solubles dans l'eau légèrement alcoolisée par la soude ou par le carbonate de soude — dans la liqueur de digestion papaïnique, — et

insolubles dans le chloroforme et l'alcool. — Leur couleur varie dans la gamme du jaune au rouge. Ils sont toujours ferrugineux — et contiennent à peu près tout le fer du foie.

Voilà leurs caractères communs. — On en distingue deux espèces :

3° A. Ces pigments sont constitués, chez *tous les vertébrés et chez le plus grand nombre des invertébrés* que nous avons examinés (mollusques, crustacés), par un composé ferrugineux, que nous appelons *ferrine*, mélangé d'une petite quantité de nucléo-albuminoïdes ferrugineux.

La *ferrine* s'obtient intégralement par la digestion papainique du foie frais ; — c'est un composé organo-métallique très voisin de la *ferratine* de Marfori et Schmiedeberg, mais s'en distinguant en ce que le fer y est moins dissimulé que dans celle-ci. Les réactions avec le ferrocyanure de potassium et le sulfhydrate d'ammoniaque sont plus rapides. Elle contient de l'hydrate ferrique combiné à un albuminoïde, voisin de l'albumine, et de la peptone.

Ces pigments aqueux, ferrugineux, examinés au spectroscope, donnent un spectre continu, sans bandes d'absorption, qui s'éteint seulement aux deux extrémités, rouge et violette.

Leurs trois traits distinctifs sont donc : *leur solubilité ; la richesse en fer ; leur spectre continu.*

4° Chez un très petit nombre d'invertébrés (c'est-à-dire chez quelques gastropodes pulmonés, dont le type est l'escargot) le pigment ferrugineux *ferrine* est remplacé par l'*hémochromogène* (ou un corps qui en est extrêmement voisin). — C'est là un fait remarquable chez ces animaux dépourvus de sang rouge parce que l'*hémochromogène* cons-

titue le noyau fondamental de l'hémoglobine, et l'un de ses principaux dérivés.

Le spectre de ce pigment est absolument caractéristique. Il présente deux bandes dans le vert, caractérisées en longueurs d'onde par les nombres suivants : [a. 568. — 557 ; et 537-522.] dont la première très nette.

Ses traits caractéristiques sont donc — solubilité, — richesse en fer ; — spectre à 2 bandes.

5° Le pigment *aqueux* du foie (obtenu par digestion papainique, ou alcali dilué) est le *même que celui de la sécrétion hépatique (bile)* c'est-à-dire que la sécrétion peut être obtenue par macération chez la plupart des invertébrés qui ont un hépato-pancréas en tubes.

Chez les vertébrés, la macération du foie est sans rapport avec la bile : néanmoins cette macération a, en commun avec la bile, le caractère spectroscopique — spectre continu.

6° B. Les pigments alcool-chloroformiques sont solubles dans le chloroforme, moins solubles dans l'alcool, très peu dans l'éther, insolubles dans l'eau. Leur couleur varie du jaune au vert brun. Ils contiennent très peu ou point de fer. On en distingue deux variétés :

7° a. La première est la *choléchrome*. C'est le pigment chloroformique du foie chez *tous les vertébrés* ; chez les mollusques, seiche, anodonte conservée à jeun pendant trois mois, ce pigment est caractérisé par sa solubilité, par l'absence de fer et par le spectre continu comme les lipochromes et les pigments biliaires des vertébrés.

8° b. Chez la plupart des autres mollusques, huître, pecten, moule, escargot, poulpe, nous avons trouvé un spectre à quatre bandes, caractéristique, et des traces de fer. Le pigment se distingue par là du précédent. Nous ne lui

avons pas donné de nom et nous ne sommes pas encore fixé sur sa nature. Mac Munn qui a étudié les extraits alcooliques de ces foies, considère leur couleur comme due à un mélange d'hémochromogène et de chlorophylle. L'hémochromogène fait, en réalité, défaut si l'on a opéré avec des précautions suffisantes. Quant à la chlorophylle (entéro-chlorophylle), nous avons quelques raisons de penser que c'est un élément étranger.

9° Un des traits les plus intéressants que nous ayons observé au cours de ces études est l'existence d'une étroite relation entre le foie et la coquille (escargot). La coquille est colorée par les mêmes pigments que l'on rencontre dans le foie : elle contient du fer comme celui-ci : et, inversement, le foie, au moment de l'accroissement de la coquille, est chargé des mêmes sels alcalino-terreux que la coquille.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

BOTANIQUE. — La Chlorophylle.

GÉOLOGIE. — Les Vosges considérées sous le double point de vue de l'orographie et de la constitution géologique, avec les relations entre ces deux ordres de faits.

Vu et approuvé : Paris, le 8 décembre 1897.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. DARBOUX

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

GRÉARD

Imp G. St-Aubin et Thevenot. — J. Thevenot, successeur, St-Dizier (Hte-Marne).
